

**UNIVERSITÉ DU QUÉBEC**

**MÉMOIRE PRÉSENTÉ À  
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES**

**COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE ET BIOLOGIE CELLULAIRES**

**PAR  
ANNET LAVALLÉE**

**IDENTIFICATION ET CARACTÉRISATION D'UN LOCUS DE FIMBRIAE DE  
TYPE IV CHEZ *ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE***

**DÉCEMBRE 2007**

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

## RÉSUMÉ

*Actinobacillus pleuropneumoniae* est une bactérie importante qui affecte le porc, causant ainsi une pleuropneumonie contagieuse. L'adhésion de ce microorganisme aux cellules épithéliales des poumons du porc est l'étape initiale lors de la colonisation de l'hôte. Les fimbriae sont régulièrement utilisés par plusieurs bactéries pathogènes pour s'attacher aux membranes muqueuses. Ils sont de plus très antigéniques et sont utilisés avec succès comme vaccin contre plusieurs bactéries pathogènes. Tout d'abord découvert chez *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, le locus des gènes *flp-rcp-tad* encode un système de sécrétion pour la synthèse et l'assemblage de fimbriae de type IV. Chez *A. actinomycetemcomitans*, la protéine Flp1 est impliquée dans l'adhésion de la bactérie, tandis que le rôle du gène *flp2* n'est pas encore connu. Nous avons identifié les gènes *flp1* et *flp2* chez *A. pleuropneumoniae* et les protéines encodées par ces gènes pourraient être de bons candidats pour la vaccination contre *A. pleuropneumoniae*. Nous avons ensuite tenté de vérifier l'immunogénicité de ces deux protéines. Nous avons tout d'abord amplifié par PCR les gènes qui encodent les protéines Flp1 et Flp2 d'*A. pleuropneumoniae* du serotype 1. Nous avons ensuite cloné ces fragments dans le vecteur d'expression pQE30. Les cellules compétentes *Escherichia coli* M15 (pREP4) ont été transformées avec chacune des constructions et les clones ont ensuite été induits pour la production des protéines Flp1 et Flp2 par l'ajout d'IPTG. Nous avons utilisé comme anticorps primaire lors du Western-blot, un sérum de porc convalescent infecté par *A. pleuropneumoniae* de sérotype 1. Ce sérum a réagit avec la protéine Flp1. Ces résultats nous indiquent que cette protéine induit une réponse immunitaire chez le porc et pourrait alors être un bon candidat pour la fabrication d'un vaccin contre *A. pleuropneumoniae*.

**Mots clés :** *Actinobacillus pleuropneumoniae*; fimbriae; *flp1*; *flp2*; facteur de virulence; protéines antigéniques; protéines recombinantes.

## **REMERCIEMENTS**

Je tiens à remercier les gens avec lesquels j'ai travaillé durant la réalisation de mes travaux de maîtrise;

Le Dr Marc Sirois

L'équipe du laboratoire : Valérie Ouellet, Vincent Roy, Jean-François Schmout, Kim Després, Karine De Carufel, Marie-Édith Nepveu-Traversy et Jean-François Vermette

L'équipe du laboratoire du Dr. Éric Asselin

L'équipe du laboratoire du Dr. Marc Beauregard

Merci

## **IMPLICATION DES AUTEURS DANS L'ARTICLE SCIENTIFIQUE**

Annet Lavallée : j'ai réalisé l'ensemble des travaux de laboratoire mentionnés dans ce document. J'ai également procédé à la version préliminaire de l'article scientifique sous la supervision de mon directeur de maîtrise, le Dr Marc Sirois.

Nancy Perreault : à titre d'étudiante de M.Sc., Nancy a participé à générer les données préliminaires aux présents travaux. C'est ainsi qu'elle a participé à l'ébauche de certains protocoles expérimentaux concernant la construction des clones et la production de protéines.

Le Dr. Marc Sirois a été le directeur et superviseur des travaux de laboratoire et il a également participé à la rédaction de l'article scientifique dans le but éventuel de le soumettre à la revue *Infection and Immunity*.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>ii</b>
<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>iii</b>
<b>IMPLICATION DES AUTEURS DANS L'ARTICLE SCIENTIFIQUE.....</b>	<b>iv</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	<b>v</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>ix</b>
<b>CHAPITRE I – <i>ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE</i> .....</b>	<b>1</b>
1.1. Historique.....	1
1.2. Étiologie.....	1
1.3. Pleuropneumonie porcine .....	3
1.3.1. Transmission de la maladie.....	3
1.3.2. Période d'incubation de la maladie.....	4
1.3.3. Pathogenèse.....	4
1.3.4. Signes cliniques.....	5
1.3.5. Lésions macroscopiques.....	6
1.3.6. Diagnostique .....	6
1.3.7. Traitement .....	7
1.4. Facteurs de virulence .....	8
1.4.1. Capsule.....	9
1.4.2. Lipopolysaccharides.....	11
1.4.3. Protéines excrétées .....	12
1.4.3.1. Toxines RTX.....	12
1.4.3.2. Protéases.....	14
1.4.4. Protéines de la membrane externe (OMP) .....	15
1.4.4.1. Système d'acquisition du fer.....	16
1.4.4.2. Lipoprotéine PalA .....	17
1.4.4.3. Lipoprotéine OmlA .....	18

1.4.4.4. Protéine AopA.....	18
1.4.4.5. Protéine inductible par le maltose.....	18
1.5. Adhérence d' <i>A. pleuropneumoniae</i> .....	19
1.5.1. Adhérence aux cellules du tractus respiratoire du porc .....	19
1.5.2. Lipopolysaccharides et adhérence.....	20
1.5.3. Fimbriae et adhérence .....	21
<b>CHAPITRE II – FIMBRIAE .....</b>	<b>23</b>
2.1. Morphologie et fonctions .....	23
2.2. Classification.....	24
2.2.1. Fimbriae de classe 1 .....	24
2.2.2. Fimbriae de type IV .....	24
2.2.2.1. Adhérence et structure.....	25
2.2.2.2. Sécrétion et caractéristiques des pilines de type IV .....	25
2.2.2.3. Fimbriae de type IV chez <i>A. pleuropneumoniae</i> .....	26
2.3. Le locus de fimbriae <i>flp-rcp-tad</i> chez <i>A. actinomycetemcomitans</i> .....	27
2.3.1. La protéine FLP .....	28
2.3.2. Les protéines RcpA et RcpB.....	29
2.3.3. Les protéines Tad .....	30
<b>CHAPITRE III – PROBLÉMATIQUE, HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE RECHERCHE .....</b>	<b>31</b>
3.1. Problématique .....	31
3.2. Hypothèse et objectifs.....	31
3.3. Description des différents chapitres du mémoire.....	33
<b>CHAPITRE IV – ARTICLE SCIENTIFIQUE.....</b>	<b>34</b>
4.1. Cloning And Characterisation Of Genes Encoding New Type 4 Fimbriae (Flp) In <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> .....	34
4.2. Abstract .....	35
4.3. Introduction.....	36
4.4. Materials and methods .....	38
4.4.1. Bacterial strains, plasmids and growth conditions.....	38

4.4.2. DNA sequencing of <i>A. pleuropneumoniae flp-rcp-tad</i> genes .....	38
4.4.3. Manipulation of DNA .....	39
4.4.4. Cloning of <i>A. pleuropneumoniae flp1</i> and <i>flp2</i> gene and expression of the recombinant proteins in <i>E. coli</i> .....	39
4.4.5. Immunoblot analysis of <i>A. pleuropneumoniae</i> Flp1 and Flp2 proteins .....	40
4.5.Results .....	40
4.5.1. Identification and sequencing of a distinct <i>flp</i> subfamily of prepilin genes in <i>A. pleuropneumoniae</i> serotype 1 .....	40
4.5.2. Production of a recombinant Flp1 and Flp2 proteins .....	42
4.5.3. Immunological detection of rFlp1 and rFlp2 expression .....	43
4.6.Discussion .....	44
4.7.Conclusion .....	47
4.8.References .....	48
4.9.Figures .....	51
4.10.Table .....	54
<b>CHAPITRE V – DISCUSSION .....</b>	<b>55</b>
5.1.Le locus de fimbriae <i>flp-rcp-tad</i> chez <i>A. pleuropneumoniae</i> .....	55
5.2.Les proteïns Flp-1 et Flp-2 chez <i>A. pleuropneumoniae</i> .....	57
5.2.1. Analyse de Flp1 .....	57
5.2.2. Analyse de Flp2 .....	58
5.2.3. Classification des protéïns Flp1 et Flp2 chez <i>A. pleuropneumoniae</i> .....	58
5.3. <i>In vitro</i> vs <i>ex vivo</i> .....	60
5.4.Flpl et Flp2 : Antigènes et/ou facteurs de virulence potentiels .....	62
<b>CHAPITRE VI – CONCLUSION .....</b>	<b>65</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>68</b>



## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.4 :Les composantes cellulaires d' <i>A. pleuropneumoniae</i> , ainsi que leurs rôles associés à la virulence .....	4
Tableau 4.1 : Strains, plasmids and primers used in this study.....	54

## LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : <i>A. pleuropneumoniae</i> sur une coupe de poumon de porc .....	2
Figure 1.2 : <i>A. pleuropneumoniae</i> isolé sur gélose sang .....	2
Figure 1.3 : Schématisation de la structure d'une molécule de LPS .....	12
Figure 1.4 : Adhérence d' <i>A. pleuropneumoniae</i> de sérotype 2 à l'épithélium alvéolaire de porc .....	20
Figure 1.5 : Photographie de fimbriae de type IV en distribution pérित्रiche à la surface d' <i>A. pleuropneumoniae</i> de sérotype 2 en microscopie électronique.....	21
Figure 2.1 : Photographie de fimbriae d' <i>Escherichia coli</i> organisés de façon pérित्रiche .....	23
Figure 2.2 : Organisation des locus <i>flp-rcp-tad</i> chez diverses bactéries .....	28
Figure 4.1: Arrangement of genes in the <i>flp-rcp-tad</i> region of the <i>A. pleuropneumoniae</i> serotype 1 strain 4074. Shown are genes and ORFs in the 12 519 kb region flanked by <i>flp-1</i> and <i>tadG</i> .....	51
Figure 4.2 : <i>flp-1</i> gene and Flp1 protein sequence in <i>A. pleuropneumoniae</i> serotype 1 strain 4074 (signal peptide et protein).....	51
Figure 4.3 : <i>flp-2</i> gene and Flp2 protein sequence in <i>A. pleuropneumoniae</i> serotype 1 strain 4074 (signal peptide et protein) .....	51
Figure 4.4 : Alignment of the predicted products of <i>flp</i> subfamily members. Three-domain structure is shown by coloured boxes (yellow, leader peptide; blue, hydrophobic region; red, variable C-terminus). The grey box shows the area of highest conservation between Flp proteins. Note the absolute conservation of the adjacent glutamate and tyrosine residues . Within the C-terminal region, a phenylalanine residue is conserved in all but one example ( <i>C. limicola</i> Flp1) .....	52

Figure 4.5 : Expression of recombinant Flp1 and Flp2 <i>A. pleuropneumoniae</i> proteins in <i>E.coli</i> M15 (pREP4). Broad-range protein molecular mass markers are shown in lane 1. Lane 3 and 5, proteins from whole-cell lysates <i>E. coli</i> M15 (pREP4) carrying recombinant proteins Flp1(lane 3) and Flp2 (lane 5) with IPTG induction; lane 2 and 4, proteins from whole-cell lysates <i>E.coli</i> M15 (pREP4) carrying recombinant proteins Flp1(lane 2) and Flp2 (lane 4) without IPTG induction. Proteins were stained with Coomassie blue. ....	53
Figure 4.6 : Western blot analysis of fimbriae subunit Flp1 and Flp2 from <i>A. pleuropneumoniae</i> serotype 1 expressed in <i>E.coli</i> M15 (pREP4). Broad-range protein molecular mass markers are shown in lane 1. Lane 2 and 4, proteins from whole-cell lysates <i>E. coli</i> M15 (pREP4) carrying recombinant proteins Flp1(lane 2) and Flp2 (lane 4) with IPTG induction; lane 3 and 5, proteins from whole-cell lysates <i>E.coli</i> M15 (pREP4) carrying recombinant proteins Flp1(lane 3) and Flp2 (lane 5) without IPTG induction. ....	53
Figure 5.1 : Organisation des gènes du locus <i>flp-rcp-tad</i> chez <i>A. pleuropneumoniae</i> .....	55
Figure 5.2 : Schématisation du passage de la protéine Flp à travers la paroi d'une bactérie gram négative.....	56
Figure 5.3 : Séquence du gène <i>flp1</i> et de la protéine Flp1 chez <i>A.pleuropneumoniae</i> sérotype 1 de la souche 4074 (peptide signal et protéine).....	57
Figure 5.4 : Séquence du gène <i>flp2</i> et de la protéine Flp2 chez <i>A.pleuropneumoniae</i> sérotype 1 de la souche 4074 (peptide signal et protéine).....	58

# CHAPITRE I

## *ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE*

### 1.1 HISTORIQUE

*Actinobacillus pleuropneumoniae* est isolé de lésions de pleuropneumonie porcine pour la première fois en 1957, en Grande Bretagne (Matthews et Pattison, 1961). La bactérie porte alors le nom d'*Haemophilus-like* et par la suite, *Haemophilus pleuropneumoniae* (Kilian et al., 1978). Cependant, après des études d'homologie d'ADN, la bactérie est transférée au genre *Actinobacillus* (Pohl et al., 1983). Un nouveau taxon est alors créé : *Actinobacillus pleuropneumoniae* (*A. pleuropneumoniae*). En 1963, Shope rapporte la présence de cette bactérie chez le porc dans plusieurs pays tels que la Suisse, le Danemark, l'Australie et le Japon (Shope, 1964). Le premier cas de pleuropneumonie au Canada est survenu en Saskatchewan en octobre 1971 (Schiefer et al., 1974). C'est à partir de 1978 que le Québec a commencé à subir des pertes économiques significatives. À ce jour, on retrouve la bactérie partout où l'industrie porcine est développée, donc répandue mondialement.

### 1.2 ÉTIOLOGIE

*A. pleuropneumoniae* est une bactérie faisant partie de la famille des *Pasteurellaceae*, tout comme le genre *Haemophilus*. Il s'agit d'un petit bâtonnet capsulé Gram négatif, non sporulé, présentant une morphologie coccobacillaire typique (figure 1.1). Les bactéries se présentent de manière isolée, en paires ou en courtes chaînes. Depuis sa découverte, la bactérie est décrite comme étant immobile (Matthews et Pattison, 1961). Cependant, beaucoup plus tard, Negrete-Abascal et al. ont réussi à démontrer la présence de flagelles sur *A. pleuropneumoniae* et leur utilité dans la mobilité de la bactérie (Negrete-Abascal et al., 2003).

À l'isolement, la bactérie est anaérobie ou micro-aérophile mais lors des repiquages, elle se comporte comme anaérobie facultative (Matthew et Pattison, 1961). Son métabolisme est de type fermentatif. Cultivé sur gélose chocolat incubée en atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub>, *A. pleuropneumoniae* forme des colonies lisses de couleur blanchâtre. Sur gélose au sang de mouton supplémentée en NAD, *A. pleuropneumoniae* de biotype 1 produit une zone de  $\beta$ -hémolyse (figure 1.2) (Matthews et Pattison, 1961). On peut aussi cultiver *A. pleuropneumoniae* sur milieu contenant de l'IsoVitaleX qui fournit le facteur V.



**FIGURE 1.1:** *A. pleuropneumoniae* de serotype 2 (←) sur une coupe de poumon de porc (Dom et al, 1994)



**FIGURE 1.2:** *A. pleuropneumoniae* isolé sur gélose sang ([http://microgen.ouhsc.edu/a\\_pleuro/a\\_pleuro\\_home.htm](http://microgen.ouhsc.edu/a_pleuro/a_pleuro_home.htm))

*A. pleuropneumoniae* peut être divisée en deux biotypes selon les exigences en NAD (nicotinamide-adénine-dinucléotide). Le NAD est un facteur de croissance, le facteur V. Les souches du biotype 1 sont NAD-dépendantes et celles du biotype 2 sont NAD-indépendantes. *A. pleuropneumoniae* est classée en 15 sérotypes différents, selon les antigènes capsulaires. Les sérotypes 1 et 5 sont subdivisés en 1a et 1b, et 5a et 5b (Nielsen, 1986; Jolie et al., 1994; Nielsen et al., 1997). Le 15<sup>ième</sup> sérotype est le dernier sérotype qui a été proposé en 2002 par Blackall et al. Les infections expérimentales et les observations effectuées sur le terrain attestent que les souches de biotype 2 sont moins virulentes que celles de biotype 1 (Dom et Haesebrouck, 1993). Ces observations démontrent également que les sérotypes 1, 5, 9 et 10 du biotype 1 sont les plus virulentes (Frey, 1995; Taylor, 1999). Au Québec, les sérotypes 1, 5 et 7 sont

prédominants, alors que le sérotype 2 est dominant dans la plupart des pays européens (Mittal et *al.* 1992).

La pleuropneumonie porcine à *A. pleuropneumoniae* est une maladie hautement contagieuse et entraîne chaque année des pertes économiques importantes chez les éleveurs. Depuis quelques années, des efforts sont investis dans l'étude des mécanismes de virulence afin de mieux comprendre les interactions de ce pathogène avec l'hôte.

### 1.3 PLEUROPNEUMONIE PORCINE

#### 1.3.1 Transmission de la maladie

*A. pleuropneumoniae* est un parasite obligatoire et il est très fragile, ne survivant que brièvement dans l'environnement. Il est spécifique à l'espèce porcine, n'ayant été qu'exceptionnellement et probablement accidentellement isolé chez d'autres espèces animales (Nicolet et *al.*, 1986). Ses voies de diffusion sont soit aériennes, par contact direct entre deux porcs, ou bien via de fines gouttelettes projetées à faible distance. La survie de l'organisme dans l'environnement est considérée comme étant d'une courte durée, identique à celle de *Pasteurella multocida* (Nicolet et *al.*, 1986). Cependant, lorsqu'il se retrouve dans du mucus ou tout autre substance organique et en milieu aqueux, il peut survivre plus d'une journée. Expérimentalement, le cobaye est sensible par voie intra-nasale, intra-péritonéale et intra-trachéale (Sebunya et Saunders, 1982). *A. pleuropneumoniae* vit au niveau du système respiratoire supérieur des porcs, plus particulièrement dans le pharynx et les amygdales.

*A. pleuropneumoniae* est généralement introduit dans un élevage sain par des porcs infectés qui transmettent la bactérie par voie aérogène. De plus, certains animaux qui guérissent de la maladie, malgré l'absence de signes cliniques, sont porteurs de la bactérie (Nicolet, 1979). Dans certains cas d'infection, la bactérie ne pénètre pas jusque dans les poumons. Elle se limite à la cavité nasale ou aux amygdales, transformant ainsi les porcs en sujets porteurs, extrêmement contagieux.

### 1.3.2 Période d'incubation de la maladie

La période de temps entre le moment où l'infection s'installe et l'apparition des symptômes est variable. La période d'incubation peut-être aussi courte que huit à douze heures pour des porcs qui n'ont jamais été en contact avec le microorganisme ou qui ne possèdent aucune immunité contre celui-ci. Dans d'autres cas, cette période d'incubation variera de quelques jours à quelques semaines (Higgins et *al.* , 1982). La virulence de la souche d'*A.pleuropneumoniae*, l'état immunitaire de l'animal et sa résistance naturelle à l'agent causal font varier la période d'incubation de la maladie et détermineront la forme clinique de la pleuropneumonie porcine.

### 1.3.3 Pathogenèse

La pathogenèse de la pleuropneumoniae porcine est complexe et sa compréhension nécessite encore plusieurs recherches approfondies sur les nombreux facteurs de virulence de la bactérie. *A. pleuropneumoniae* est généralement inhalée et pénètre directement dans les alvéoles pulmonaires via la trachée et les bronches. Les porcs peuvent cependant être infectés par le biais de la circulation sanguine (Nicolet, 1979). En effet, l'inoculation intraveineuse de porcs de la bactérie d'une souche de biotype 1 a débouché sur des signes caractéristiques de la maladie, c'est-à-dire, une pneumonie hémorragique nécrosante et une pleurésie fibrineuse. La pathogénicité de l'*A. pleuropneumoniae* est considérée comme étant multifactorielle (Nicolet, 1979). Plusieurs facteurs de virulence de l'agent infectieux, comprenant la capsule, les exotoxines (toxines Apx), les endotoxines, les adhésines, les protéines de fixation de la transferrine, les protéases sécrétées et les protéines de la membrane externe, jouent un rôle important dans la pathogenèse d'*A. pleuropneumoniae*. Ces facteurs de virulence seront décrits plus en détail dans la section 1.4. En effet, le pouvoir pathogène de la bactérie ne dépend pas seulement de l'état immunitaire de l'hôte et des facteurs environnementaux. De plus, des infections concomitantes impliquant d'autres agents pathogènes du tractus respiratoire peuvent favoriser le développement de la pleuropneumonie (Nicolet, 1979).

### 1.3.4 Signes cliniques

Lors de l'infection d'un porc par *A. pleuropneumoniae*, le système immunitaire de ce dernier est stimulé, entraînant la production d'anticorps. Le titre d'anticorps atteint son maximum après trois à quatre semaines et se maintient pendant de nombreux mois (Bossé et al., 1992). Lors de l'infection, les macrophages alvéolaires et les neutrophiles seront très importants pour le système de défense des poumons. Cependant, la bactérie, à l'aide de ces nombreux facteurs de virulence, déjoue dans la majorité des cas le système immunitaire du porc et réussit à coloniser l'hôte.

Il existe trois formes cliniques de la pleuropneumonie porcine : suraiguë, aiguë et chronique. Dans les cas suraigus, des porcs peuvent être retrouvés morts même si aucun symptôme de la pleuropneumonie n'était apparent quelques heures auparavant. La toux, l'hyperthermie (40,5 - 42,0°C), l'abattement, la dyspnée et l'anorexie font partie des signes cliniques usuels. La mort survient dans les 24 heures (Mylrea et al., 1974). Après la mort de l'animal, des écoulements sanguinolents au niveau des narines et la cyanose aux extrémités et à l'abdomen sont fréquents.

Présentant une évolution moins rapide, la forme aiguë peut déboucher sur une forme chronique. Les animaux ont une température rectale de 40,5 à 41°C. Ils sont abattus, anorexiques et présentent un syndrome respiratoire grave avec dyspnée et toux. La mort peut survenir dans les deux à quatre jours et les porcs qui survivent, demeurent porteurs et excréteurs du germe (Mylrea et al., 1974). La transmission par voie indirecte joue un rôle important lorsque la maladie évolue sur un mode aigu et que le germe est excrété massivement dans les sécrétions nasales.

Les formes chroniques se manifestent en général par de la toux occasionnelle et des retards de croissance. La bactérie est présente dans des lésions pulmonaires nécrotiques et peut envahir les voies respiratoires antérieures et les amygdales (Harrison et al., 1978). Notons que la maladie frappe les sujets de tous les âges.



### 1.3.5 Lésions macroscopiques

Lors de l'infection d'un porc par *A. pleuropneumoniae*, la plupart des lésions pathologiques sont localisées au niveau du tractus respiratoire. Les zones pulmonaires affectées sont d'une couleur rouge-noir, très fermes et non affaissées, avec des zones hémorragiques jusqu'à six centimètres de diamètre (Sanford et Josephson, 1981). La présence d'adhérences fibrineuses entre les plèvres est manifeste. L'aspect nécro-hémorragique du tissu lésé de même que l'œdème interlobulaire sont évidents à la coupe. L'inflammation du péricarde, avec présence de fibrines, n'est pas rare. Dans les formes suraiguë et aiguë, les lésions pathologiques se caractérisent par une pneumonie hémorragique nécrosante et une pleurésie fibrineuse. La trachée et les bronches sont alors remplies d'un exsudat mousseux et sanguinolent. Dans les formes chroniques, des nodules de différentes tailles, entourés d'une épaisse capsule de tissu conjonctif et des foyers de nécrose sont visibles notamment sur les lobes diaphragmatiques (Sanford et Josephson, 1981). Les lésions nécrotiques peuvent héberger des bactéries durant plusieurs mois et les animaux peuvent transmettre l'infection. Des lésions de pleurésie fibrineuse se développent et, lors de guérison, elles sont souvent les seules lésions visibles à l'abattoir. La mise en évidence d'un pourcentage des lésions de pleurésie chronique à l'abattage doit faire soupçonner l'infection de l'élevage par *A. pleuropneumoniae* (Mylrea et al., 1974; Sanford et Josephson, 1981; Nielsen, 1976; Rosendal et al., 1985).

### 1.3.6 Diagnostic

Le diagnostic en laboratoire d'*A. pleuropneumoniae* est généralement posé par des méthodes bactériologiques ou sérologiques. Les méthodes bactériologiques prouvent directement la présence de la bactérie. Il est possible de cultiver la bactérie à partir des poumons, en présence de lésions pathologiques aiguës. Lors des examens bactériologiques de routine, des échantillons de lésions pulmonaires sont cultivés sur gélose-sang avec une souche de *Staphylococcus aureus*. Cette souche va produire de l'hémolysine  $\beta$  et fournir du NAD. Les souches de biotype 1 vont proliférer en petites

colonies à proximité de la strie, entourées par une zone d'hémolyse claire. Il s'agit du test de CAMP (Christie-Atkins-Munch-Petersen). L'activité uréatique et la fermentation du mannitol sont aussi des tests utilisés pour le diagnostic. Les méthodes sérologiques sont basées sur la mesure des anticorps contre *A. pleuropneumoniae*. Les méthodes de détection des anticorps les plus utilisées sont le test de fixation du complément (CFT) et les méthodes ELISA (enzyme linked immuno-sorbent assays) (Jansen, 1994).

En 1996, Gram et *al.* mettent au point une nouvelle technique de détection de la bactérie : Test PCR (polymerase chain reaction). Cette méthode est destinée à la détection de tous les sérotypes de l'*A. pleuropneumoniae*. Certains gènes sont utilisés dans la détection PCR de la bactérie. Par exemple, le gène de la capsule *cpx* est retrouvé chez les 15 sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* et est fréquemment utilisé lors de test PCR diagnostique (Klein et al., 2003). Récemment, une quatrième toxine RTX, la protéine ApxIV, a été caractérisée (Schaller et al., 1999). Le gène *apxIVA* est très spécifique à l'espèce *A. pleuropneumoniae*, étant à son tour, de plus en plus utilisé pour le diagnostic par PCR.

### 1.3.6. Traitement

Lors de l'infection, le contrôle des facteurs environnementaux est tout d'abord essentiel. Le traitement par antibiotique n'est efficace que durant la phase initiale de la maladie. Une résistance acquise a cependant été décrite pour plusieurs antibiotiques comprenant entre autre les tétracyclines et la pénicilline. En Belgique, environ 10% des souches isolées en 1992 étaient résistantes aux tétracyclines (Dom et *al.*, 1994). Il est ainsi devenu nécessaire de procéder à des tests de sensibilité aux antibiotiques.

Dans plusieurs cas, la maladie est intraitable, d'où l'importance de prévenir l'infection entre autre par la vaccination. Les vaccins à cellules complètes vont réduire la mortalité après l'infection par le sérotype homologue, mais ne vont pas protéger le porc des infections aux autres sérotypes d'*A. pleuropneumoniae*. L'absence de certains facteurs

de virulence dans les bactérines pourrait expliquer cette protection limitée. Cependant, les vaccins composés de protéines retrouvées chez tous les sérotypes de la bactérie pourraient conférer une immunité croisée. Un vaccin contenant des toxines Apx et une protéine de 42 kDa de la membrane externe a déjà été utilisé. La protection obtenue par ce vaccin est meilleure que celle induite par les bactérines et n'est pas spécifique à un sérotype particulier. Ce vaccin entraîne une réduction des symptômes cliniques et des lésions pulmonaires dans les cas de pleuropneumonie aiguë et chronique (Kobisch et van den Bosch, 1992). Cependant, aucun vaccin n'a encore démontré une efficacité contre l'infection à *A. pleuropneumoniae*, d'où l'importance de continuer la recherche sur les facteurs de virulence.

#### 1.4 FACTEURS DE VIRULENCE

La diversité des mécanismes utilisés par *A. pleuropneumoniae* pour induire la maladie chez l'hôte est en effet responsable des difficultés rencontrées pour la mise au point de traitements préventifs efficaces. Dans le but de survivre dans les poumons d'un porc, *A. pleuropneumoniae* doit mettre en œuvre une série de mécanismes afin de diminuer ou de contourner les défenses immunitaires de l'hôte. Il est maintenant reconnu que le pouvoir pathogène d'*A. pleuropneumoniae* repose sur l'expression de nombreux facteurs de virulence (Jacques M., 2004). Plusieurs groupes de recherche localisés à travers le monde étudient les facteurs de virulence de cette bactérie et un grand nombre de ces facteurs sont encore inconnus.

En effet, lorsque *A. pleuropneumoniae* s'établit dans les poumons du porc, plusieurs protéines sont considérées comme facteurs de virulence. Toutes les protéines qui permettent au pathogène de survivre dans les poumons et les protéines qui sont impliquées dans les lésions tissulaires chez l'hôte peuvent être considérées comme étant des facteurs de virulence (Tableau 1.4). Les lésions tissulaires sont directement produites par une protéine ou indirectement en entraînant une réaction inflammatoire chez le porc. La présente section passe en revue différents facteurs de virulence d'*A. pleuropneumoniae* ainsi que leur caractère immunogène.

### 1.4.1 Capsule

Toutes les souches d'*A. pleuropneumoniae* possèdent une capsule. Celle-ci est essentiellement composée de séquences répétées d'oligosaccharides dérivés. Elle protège la bactérie contre la phagocytose et la lyse par activation du complément (Jansen, 1994).

Les gènes impliqués dans la synthèse et l'exportation des polysaccharides capsulaires (PC) ont été identifiés chez *A. pleuropneumoniae* sérotype 5 et leur organisation est similaire à celle d'*Haemophilus influenzae* type b et de *Neisseria meningitidis* groupe B, des pathogènes reconnus (Frosch et al., 1991). Quatre gènes servent à la synthèse des PC chez *A. pleuropneumoniae* sérotype 5. Il s'agit des gènes *cps5ABCD* (*capsular polysaccharide synthesis serotype 5*) (Ward et al., 1998). Pour l'exportation des PC, quatre autres gènes sont impliqués : *cpxDCBA* (*capsular polysaccharide export*). Ils sont situés en amont du gène de synthèse *cps5A* et sont transcrits dans le sens inverse du locus *cps* (Ward et Inzana, 1997).

La capsule est requise pour la virulence bactérienne puisque les mutants non capsulés ne causent pas de symptômes cliniques ni de lésions pulmonaires chez le porc (Inzana et al., 1993). De plus, les anticorps dirigés contre la capsule rendent la bactérie plus susceptible à la phagocytose et peuvent jouer un rôle dans la protection partielle sérotype-spécifique induite par la vaccination par des bactérines vivantes de souches atténuées (Inzana et al., 1988).

TABLEAU 1.4

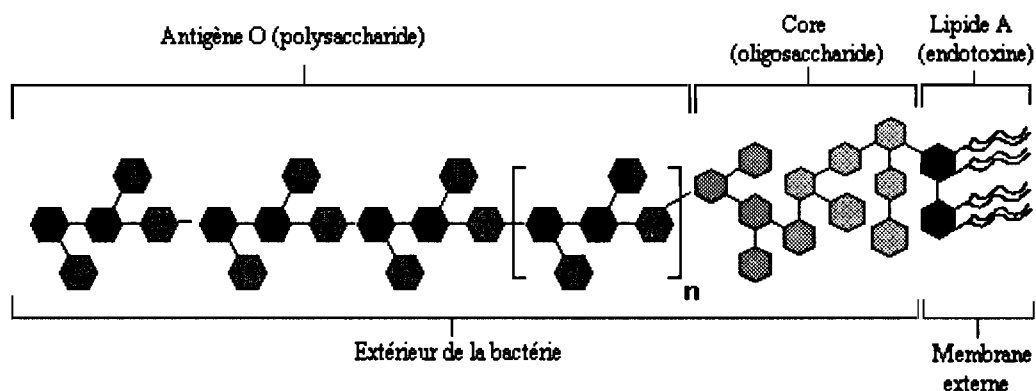
Les composantes cellulaires d'*A. pleuropneumoniae*, ainsi que leurs rôles associés à la virulence.

Composantes cellulaires		Rôles dans la virulence	Références
Capsule		Antiphagocytaire et adhérence cellulaire	Ward <i>et al.</i> , 1998; Ward & Inzana, 1994
Lipopolysaccharides (LPS)		Adhésion cellulaire et ↑ cytokines inflammatoires	Paradis <i>et al.</i> , 1994 et 1999; Bélanger <i>et al.</i> , 1990 et 1994
Protéines excrétées	- Toxines Apx	Lyse cellulaire et ↑ cytokines inflammatoires	Prideaux <i>et al.</i> 1999; Haesebrouck <i>et al.</i> , 1997
	- Protéases	Dégrade les IgA, l'actine et l'hémoglobine	Garcia-Cuellar <i>et al.</i> 2000; Negrete-Abascal <i>et al.</i> , 2000
Protéines périplasmiqes	- Ohr, SodC et SodA	Protection contre les radicaux libres exogènes et les hydroperoxydes	Forest <i>et al.</i> , 2000; Langford <i>et al.</i> , 1996; Shea & Mulks, 2002
	- Uréase (UreABC)	Inconnu, essentielle à la virulence	Bossé <i>et al.</i> , 2000, 1997; Tascon <i>et al.</i> , 1997
	- Lipoprotéine ApaA	Acquisition de nutriments essentiels	Martins & Mulks, 1999
	- L'enzyme 3-déhydroquinase (AroQ)	Synthèse des composés aromatiques	Ingham <i>et al.</i> , 2002; Lalonde <i>et al.</i> , 1994
	- Enzyme biosynthèse de la riboflavine (RibA)	Synthèse de la flavine	Fuller <i>et al.</i> , 1996; Fuller & Mulks, 1995
	- L'hémoprotéine NADPH-sulfite réductase (CysI)	Synthèse des molécules de cystéine	Willson <i>et al.</i> , 2002
Protéines de la membrane externe (OMP)	- TbpA, TbpB	Système d'acquisition du fer	Baltes <i>et al.</i> 2001; Haesebrouck <i>et al.</i> , 1997
	- Lipoprotéine PalA et OmlA	Inconnu	Frey <i>et al.</i> , 1996; Ito <i>et al.</i> , 1998
	- Protéine AopA	Inconnu	Cruz <i>et al.</i> , 1996
	- Protéine inductible par le maltose	Séquestration du maltose exogène	Deneer & Potter, 1989b
	- Fimbriae (ApfA)	Adhésion cellulaire	Zhang <i>et al.</i> 2000; Pijoan & Trigo, 1990

### 1.4.2 Lipopolysaccharides

La membrane externe des bactéries Gram-négatives est majoritairement composée de lipopolysaccharides (LPS). Trois régions bien définies composent les LPS : l'antigène O, le core et le lipide A (figure 1.3). Le core est un oligosaccharide qui contient l'acide 2-keto-3-deoxyoctulosonique (KDO) tandis que l'antigène O est un polysaccharide fait d'unités répétées. Le LPS sera rugueux ou semi-rugueux comme chez le sérotype 1, ou lisse comme chez le sérotype 2 (Bélangier et *al.*, 1992) dépendamment de la présence et du nombre d'unités répétées de l'antigène O. Les antigènes O sont synthétisés séparément par des enzymes encodés par les gènes *rfb* (Labrie J. et al, 2002). L'antigène O est ensuite transféré et lié au lipide A-core préformé du côté périplasmique de la membrane interne. Le LPS complet est ensuite transféré à la surface par des mécanismes encore inconnus. L'antigène O varie considérablement à travers les sérotypes, permettant la différenciation des sérotypes, tandis que le polysaccharide central (le core) demeure très conservé.

Le lipide A est un composé toxique, constituant une endotoxine, c'est-à-dire une toxine retenue dans la cellule bactérienne et libérée lors de la lyse. Le LPS contribue à la formation des lésions typiques d'*A. pleuropneumoniae*, mais n'en est pas responsable. En effet, le LPS purifié a le potentiel de provoquer des dommages aux tissus des poumons du porc. Cependant les lésions induites ne sont ni hémorragiques ni nécrotiques (Fenwick et Osburn, 1986). Le LPS provoque une inflammation avec infiltration cellulaire par le biais d'une activation de la voie alterne du complément et de la stimulation de la synthèse de cytokines par les macrophages (Udeze et *al.*, 1987).



**FIGURE 1.3 :** Schématisation de la structure d'une molécule de LPS. La molécule de LPS est composée de trois régions : le lipide A, le core et l'antigène O.

De plus, par l'entremise du lipide A, le LPS se lie à l'hémoglobine du porc afin d'acquérir le fer étant un nutriment essentiel pour la bactérie (M. Jacques et al., 2004). Il a aussi été impliqué dans l'adhérence d'*A. pleuropneumoniae* au mucus, à la trachée et aux sections de poumons congelés (Paradis et al., 1994). L'implication du LPS dans l'adhérence du pathogène sera expliquée plus en détail à la section 1.5 réservée à l'adhérence d'*A. pleuropneumoniae*.

Le LPS possède la propriété de stimuler le système immunitaire porcin afin d'induire la production d'anticorps. Cependant, comme l'antigène O varie considérablement à travers les sérotypes, le LPS joue un rôle dans la protection partielle sérotype-spécifique induite par la vaccination avec des bactérines (Inzana et al., 1988).

### 1.4.3 Protéines excrétées

#### 1.4.3.1 Toxines RTX

*A. pleuropneumoniae* produit quatre exotoxines différentes qui font partie de la famille des toxines RTX (Repeats in the structural Toxin) (Schaller et al., 1999 ; Frey et al.,

1993). Les toxines RTX ont la particularité d'être sécrétées dans l'organisme hôte. Elles atteignent ainsi les cellules cibles, s'insèrent dans la membrane et forment des canaux membranaire perméable à certains ions, ce qui provoque les dommages tissulaires (Lally, 1999 ; Maier et al., 1996). Ces toxines produites par plusieurs pathogènes Gram-négatifs ont en commun une séquence répétée riche en glycine à leur extrémité C-terminale, d'où leur nom RTX (Lally et al., 1999 ; Tascon et al., 1996). Chez *A. pleuropneumoniae*, ces exotoxines portent les noms ApxI, ApxII, ApxIII et ApxIV (*A. pleuropneumoniae* RTX toxins) (Schaller et al., 1999 ; Frey et al., 1993). Avec leur activité cytotoxique, il s'agit d'un des plus importants facteurs de virulence. De plus, ces toxines sont essentielles à la virulence de la bactérie (Maier et al., 1996 ; Frey, 1995).

ApxI et ApxII possèdent une activité hémolytique et cytoxique pour les macrophages alvéolaires et les neutrophiles. Cette activité est cependant plus importante chez ApxI (Kamp et al., 1991). C'est pourquoi les sérotypes 1, 5, 9, 10, 11 et 14, qui sécrètent ApxI sont plus virulents. Il s'agit d'une protéine de 105 Kilodaltons (kDa) (Blackall et al., 2002 ; Schaller et al., 2001). La protéine ApxII, d'une taille de 103 kDa, est produite par tous les sérotypes sauf le 10 et 14 (Blackall et al., 2002 ; Schaller et al., 2001 ; Janson et al., 1992b ; Kamp et al., 1991). Les gènes qui codent pour ApxI se retrouvent dans un unique opéron comprenant le gène de l'activateur post-transcriptionnel *apxIC*, le gène de la protéine structurale *apxIA* et les gènes de sécrétions *apxIB* et *apxID*, arrangés dans l'ordre *apxICABD* (Gygi et al., 1992). Cependant, l'organisation génétique de l'opéron d'ApxII est différente de celle d'autres opérons des toxines RTX car il ne possède pas les gènes de sécrétion contigus au gène de la protoxine (*apxIIC* et *apxIIA*).

ApxIII est une protéine de 120 kDa qui est dépourvue d'activité hémolytique, mais a une activité fortement cytotoxique contre les macrophages alvéolaires et les neutrophiles. L'opéron *apxIIICABD* est présent dans les sérotypes 2, 3, 4, 6, 8 et 15 (Blackall et al., 2002 ; Janson et al., 1994 ; Kamp et al., 1991).



ApxIV est la quatrième et dernière exotoxine identifiée et sa taille est de 202 kDa chez le sérotype 1 et de 170 kDa chez le sérotype 3. Elle possède une faible activité hémolytique et est exclusivement produite *in vivo*. En effet, la protéine ApxIVA n'a pu être détectée dans les cultures *in vitro* d'*A. pleuropneumoniae*, mais les anticorps de porcs infectés expérimentalement avec les sérotypes 1, 5 et 7 ont tous réagi au recombinant ApxIVA (Schaller et *al.*, 1999). Tous les sérotypes possèdent la région codante *apxIVA* et la production de la toxine a été démontrée chez tous les sérotypes sauf pour le sérotype 15 (Blackall et *al.*, 2002 ; Cho et Chae, 2001 ; Schaller et *al.*, 2001 et 1999).

Les toxines Apx jouent un rôle déterminant dans la pathogenèse de la pleuropneumonie porcine. En effet, ces toxines permettent d'échapper à la première ligne de défense du porc. La plupart des sérotypes sécrètent une combinaison de ces toxines. Le degré de virulence des sérotypes dépendrait en fait de ces combinaisons. Par exemple, les sérotypes 1, 5, 9 et 11 qui sécrètent les toxines ApxI et ApxII sont plus virulents que les sérotypes 2, 4, 6 et 8 qui sécrètent les toxines ApxII et ApxIII (Tascon et *al.*, 1996). De plus, ces quatre exotoxines sont de puissants immunogènes chez les porcs infectés (Devenish et *al.*, 1990 ; Frey et Nicolet, 1991). Un essai d'immunisation de porcs a été réalisé à l'aide d'une souche de sérotype 7 dont le gène activateur de toxine *apxIIC* est inactif (Prideaux et *al.*, 1999). La bactérie mutante produit ainsi la toxine mais celle-ci demeure inactive. Cette souche a démontré une virulence atténuée et a conféré une protection efficace contre une infection par *A. pleuropneumoniae* de sérotype 1. Les toxines Apx sont des constituantes importantes dans les vaccins administrés chez les porcs contre une infection causée par *A. pleuropneumoniae* (Bossé et *al.*, 1992).

#### 1.4.3.2 Protéases

En plus des exotoxines Apx, *A. pleuropneumoniae* sécrète plusieurs protéases, contribuant également à la formation de lésions pulmonaires chez le porc en dégradant d'importantes composantes tissulaires (Tascon et *al.*, 1996). Ces protéases dégradent les IgA et les IgG de porc ainsi que l'actine. L'hémoglobine porcine serait aussi dégradée

par ces protéases dans le but d'acquérir le fer pour les besoins nutritionnels de la bactérie (Negrete-Abascal et *al.*, 1994). *A. pleuropneumoniae* de sérotype 1 produit une protéase de 200 kDa qui est reconnue par les anticorps contenus dans le sérum de porcs convalescents, infectés par le sérotype 1, 2, 5, 8 et 9 (Negrete-Abascale, 1998). Il s'agit d'une protéine immunogène dont l'activité protéolytique a été observée chez tous les sérotypes. D'autres protéases d'environ 70 kDa sont aussi produites. Elles ont la capacité de dégrader seulement les IgA de porc (Negrete-Abascal et *al.*, 1994). *A. pleuropneumoniae* produit également une métalloprotéase de 24 kDa (Garcia-Cuellar et *al.*, 2000). Elle est présente chez les sérotypes 1 à 12 et est reconnue par les anticorps présents dans le sérum de porcs convalescents. Les protéases inactivées pourraient donc être utilisées dans la stimulation du système immunitaire de l'hôte.

#### **1.4.4 Protéines de la membrane externe (OMP)**

Les protéines immunogènes chez le porc sont des protéines exposées à l'extérieur de la bactérie, c'est-à-dire des protéines ancrées dans la membrane externe (Haesbrouck et *al.*, 1997; Cruz et *al.*, 1996). *A. pleuropneumoniae* produit plusieurs protéines de la membrane externe, aussi désignées OMP (Outer Membrane Proteins). Des conditions particulières vont influencer la production de certaines protéines comme une restriction en fer ou en maltose, ce qui permettrait à la bactérie d'exprimer certaines protéines essentielles à un stade d'infection en particulier (Deneer et Potter, 1989a et 1989b). Dû à leur pouvoir immunogène, ces protéines sont d'une grande importance pour l'obtention d'un vaccin efficace (Twhaits et Kadis 1991). En effet, il a été démontré que des extraits de membrane externe permettent de stimuler le système immunitaire du porc (Beaudet et *al.*, 1994). Chez *A. pleuropneumoniae*, on retrouve entre autre des protéines de fixation de la transferrine qui sont impliquées dans le système d'acquisition du fer, les lipoprotéines PalA et OmlA et la protéine AopA.

#### 1.4.4.1 Système d'acquisition du fer

Le fer est un nutriment essentiel pour la croissance de la bactérie. Cependant, il n'est pas directement disponible dans l'environnement extracellulaire de l'hôte. En fait, il forme des complexes avec la transferrine et la lactotransferrine ou est contenu dans l'hème de l'hémoglobine (Gerlach et *al.*, 1992). Pour pouvoir se procurer le fer, *A. pleuropneumoniae* met en œuvre différents systèmes d'acquisition dont les protéines liant la transferrine, les protéines liant l'hémoglobine ainsi que les récepteurs hydroxamate ferrique (Jacques M. et *al.*, 2004).

Les protéines liant la transferrine sont les récepteurs de transferrine Tbps (Transferrin-binding proteins) que l'on retrouve chez les *Pasteurellaceae* dont *A. pleuropneumoniae*. Deux gènes codant pour des protéines de liaison à la transferrine chez la bactérie de sérotype 7 sont identifiés en 1995. Il s'agit du gène *tbpA* qui code pour une protéine Tbp1 de 102 kDa et du gène *tbpB* qui code pour la protéine Tbp2 de 60 kDa (Gonzalez et *al.*, 1995). Les deux gènes sont organisés dans le même opéron, précédés par les gènes *tonB-exbBD* qui sembleraient aussi essentiels dans le mécanisme d'acquisition du fer suite à la fixation de la transferrine (Tonipitak et *al.*, 2000). Les protéines Tbps d'*A. pleuropneumoniae* sont spécifiques aux transferrines porcines, jouant ainsi un rôle dans la spécificité de l'hôte à la bactérie. La protéine Tbp1 forme un canal transmembranaire au niveau de la membrane externe et Tbp2 est une lipoprotéine ancrée à la membrane externe. Ces deux protéines vont être présentes lorsque *A. pleuropneumoniae* se retrouve dans un milieu restreint en fer (Haesebrouck et *al.*, 1997; Deneer et Potter, 1989a).

La protéine Tbp2 est de plus essentielle à la virulence car lorsque le gène *tbpB* est inactivé, la bactérie n'est plus en mesure d'utiliser le fer, étant ainsi incapable de causer la maladie (Baltes et *al.*, 2001). De plus, les Tbps sont des protéines de surface, donc des antigènes potentiels. En effet, les Tbps contribuent à la protection des porcs contre une infection au pathogène. Cependant elles ne sont pas suffisantes, car l'immunisation des porcs avec la Tbp2 confère une protection limitée contre une infection expérimentale avec les souches homologues (Gerlach et *al.*, 1992; Rossi-Campos et *al.*, 1992).

*A. pleuropneumoniae* produit aussi deux protéines différentes de 75 kDa et de 105 kDa qui vont lier l'hémoglobine dans le but d'utiliser le fer lors de l'infection (Archambault et al., 2003). Celle de 75 kDa va lier aussi bien l'hémine porcine que l'hémoglobine et celle de 105 kDa démontre une homologie avec la protéine HgbA, une protéine liant l'hémoglobine chez d'autres *Pasteurellaceae* (Jacques M., 2004).

La bactérie utilise aussi les ferrichromes comme source de fer à l'aide de récepteur d'hydroxamate ferrique aussi nommé Fhu (Ferric hydroxamate uptake). Il existe quatre gènes pour la formation de ces récepteurs : *fhuC*, *fhuD*, *fhuB* et *fhuA*. La protéine FhuA, de 77 kDa, sert de récepteur aux ferrichromes, et FhuD, de 35.6 kDa, est responsable du transport des ferrichromes vers la membrane interne. FhuB et FhuC, de 69.4 et 28.5kDa servent de transporteurs ABC pour faire pénétrer l'hydroxamate ferrique (Mikael et al., 2002; Mikael et al., 2003). Le complexe de protéines TonB-ExbBD va fournir l'énergie nécessaire au transport des ferrichromes. Une restriction en fer dans le milieu de la bactérie ne va pas influencer la production des récepteurs aux ferrichromes. De plus, une mutation dans le gène *fhuA* va abolir le système de transport des ferrichromes mais les mutants sont capables d'utiliser d'autres sources de fer tel l'hémoglobine ou la transferrine (Mikael et al., 2003).

#### 1.4.4.2 Lipoprotéine PalA

La lipoprotéine PalA est une OMP de 14 kDa qui est produite suite à l'expression du gène *pala*. Peu de données sont présentement disponibles quant au rôle dans la virulence de cette protéine. Il s'agit d'une protéine très immunogène qui constitue un candidat intéressant pour la production d'un vaccin, car elle réagit fortement avec le sérum de porcs convalescents provenant de tous les sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* (Frey et al., 1996). Cependant, un vaccin contenant cette protéine et les sous-unités ApxI et ApxII ne serait pas efficace car PalA annulerait l'effet protecteur des anticorps anti-ApxI et anti-ApxII (Frey et al., 1996). Il s'agirait alors d'une mauvaise combinaison de protéines pour l'obtention d'un vaccin efficace.

#### 1.4.4.3 Lipoprotéine OmlA

OmlA est une lipoprotéine de la membrane externe de 39 kDa (Gerlach et *al.*, 1993). Le gène *omlA* qui code pour cette protéine, est présent chez les sérotypes 1 à 12 et la protéine qui en résulte est très immunogénique. L'immunisation de porcs avec la protéine purifiée démontre une diminution du taux de mortalité et des signes cliniques sans toutefois empêcher l'apparition de lésions pulmonaires (Gerlach et *al.*, 1993). Les anticorps contre cette protéine contribuent ainsi à la protection de l'hôte contre une infection par *A. pleuropneumoniae* sans toutefois être suffisants.

#### 1.4.4.4 Protéine AopA

Le gène *aopA* d'*A. pleuropneumoniae* code pour la protéine AopA (*Actinobacillus pleuropneumoniae* outer membrane protein) de 48 kDa. Après vaccination de porcs avec des extraits de membrane externe, AopA se révèle faiblement immunogène (Mulks et Thacker, 1988). En plus d'être immunogène, cette protéine se retrouve chez les sérotypes 1 à 12 d'*A. pleuropneumoniae*. AopA est donc une protéine intéressante pour la fabrication d'un vaccin.

#### 1.4.4.5 Protéine inductible par le maltose

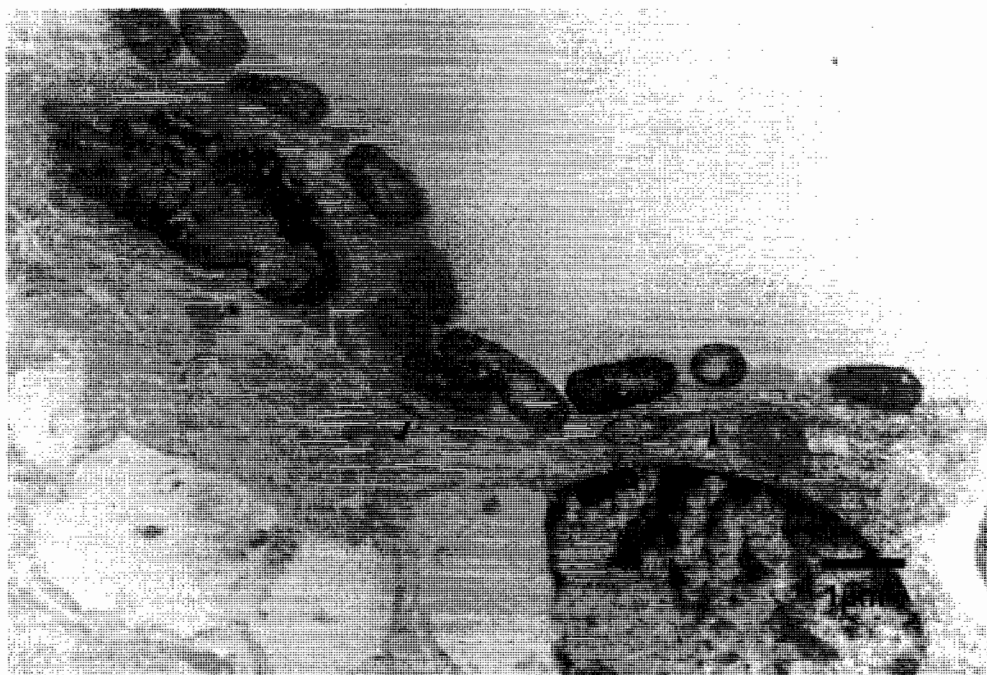
Certains gènes d'*A. pleuropneumoniae* vont être exprimés seulement dans des conditions particulières. Par exemple, dans un milieu où l'on ajoute du maltose, la bactérie va augmenter la production d'une protéine de 42 kDa (Deneer et Potter, 1989b). Cette protéine agit comme un canal membranaire permettant le passage à travers la membrane du maltose provenant de l'extérieur. Les sérotypes 1, 2, 3, 5, 6 et 7 produisent la protéine qui est reconnue par les anticorps contenus dans le sérum d'un porc convalescent à la maladie causée par *A. pleuropneumoniae* de sérotype 1 (Deneer et Potter, 1989b). Le gène codant pour cette protéine n'a pas encore été caractérisé.

## 1.5 ADHÉRENCE D'*A. PLEUROPNEUMONIAE*

### 1.5.1 Adhérence aux cellules du tractus respiratoire du porc

Le système respiratoire porcin permet à l'animal de se défendre contre les micro-organismes tel *A. pleuropneumoniae*. En effet, les cils et le mucus permettent l'expulsion des micro-organismes par les voies naturelles, les amygdales de l'oropharynx contiennent des cellules du système immunitaire qui luttent contre ces micro-organismes et les macrophages alvéolaires constituent une ligne de défense importante.

On retrouve chez certaines bactéries, dont *A. pleuropneumoniae*, des facteurs d'adhésion tels que des fimbriae, permettant ainsi au pathogène d'adhérer et d'établir des micro-colonies dans le tractus respiratoire supérieur. Les lipopolysaccharides, retrouvés chez les bactéries Gram-négatives comme *A. pleuropneumoniae*, seraient aussi impliqués dans l'adhérence de la bactérie. Il a été démontré que les sérotypes 1 et 5 retrouvés dans les infections aiguës, n'adhèrent qu'en faible quantité au niveau du tractus respiratoire supérieur, tandis que les sérotypes 2 et 7, étant moins virulents, adhèrent à un fort degré, expliquant ainsi leur persistance dans l'hôte et leur association avec une forme chronique de la maladie (Bélangier et *al.*, 1990). Il a de plus été démontré qu'*A. pleuropneumoniae* de sérotype 2 adhère *in vivo* aux cellules alvéolaires de type I et II et aux cils des bronchioles terminales du porc (figure 1.4) (Dom et *al.*, 1994). Ces résultats suggèrent que l'adhérence d'*A. pleuropneumoniae* au tractus respiratoire inférieur constitue une étape initiale importante dans la pathogenèse. Cette adhérence mènerait de plus à une forte concentration locale de toxines Apx.



**FIGURE 1.4 :** Adhérence d'*A. pleuropneumoniae* de sérotype 2 à l'épithélium alvéolaire de porc (Dom et *al.*, 1994)

### 1.5.2 Lipopolysaccharides et adhérence

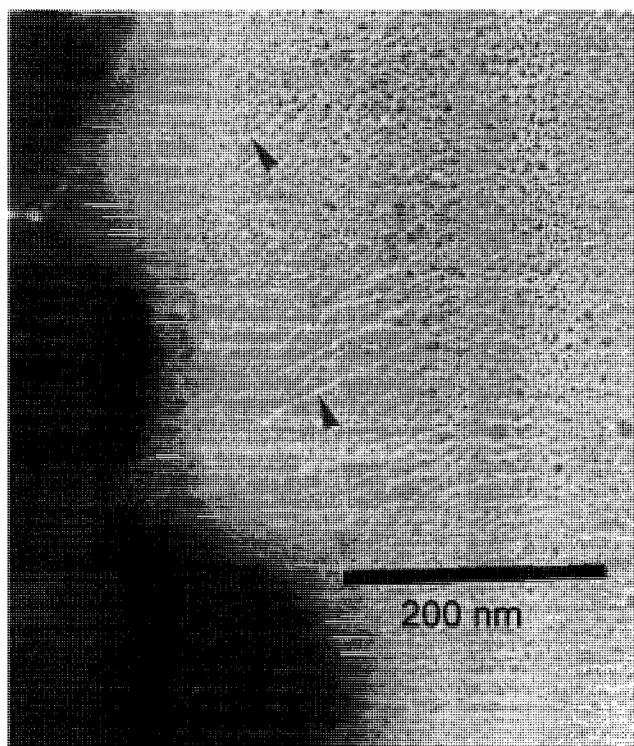
Lors d'une infection, les bactéries colonisent les muqueuses et adhèrent à leur surface. Les adhésines bactériennes se lient à des récepteurs spécifiques situés sur les cellules cibles. La reconnaissance et le processus d'attachement sont considérés comme les premières étapes permettant l'envahissement de l'organisme.

L'adhésion *in vitro* d'*A. pleuropneumoniae* aux cellules épithéliales trachéales, à des sections pulmonaires congelées et au mucus respiratoire ont été décrites (Bélanger et *al.*, 1990; Bélanger et *al.*, 1992). Dans cette adhésion, des lipopolysaccharides de haut poids moléculaire semblent impliqués. En effet, chez *A. pleuropneumoniae*, le LPS constitue l'adhésine majeure. La fraction de LPS de haut poids moléculaire, contenant le KDO et l'antigène O, est efficace dans l'inhibition de l'adhérence (Paradis et *al.*, 1994). On retrouve de plus une classe de protéines de 38,5 kDa dans les cellules du tractus respiratoire du porc qui est identifiée comme une classe de récepteurs potentiels des LPS

(Paradis et *al.*, 1999). Les protéines des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de l'hémoglobine porcine, isolées des sécrétions du tractus respiratoire, peuvent également lier les LPS (Bélanger et *al.*, 1995).

### 1.5.3 Fimbriae et adhérence

Les fimbriae sont des protéines jouant un rôle primordial lors de l'infection de l'hôte par *A. pleuropneumoniae*. Ces protéines seraient aussi impliquées dans l'évènement initial de l'infection qui est l'adhésion du pathogène aux cellules épithéliales du rhino-pharynx. En effet, des fimbriae ont été observés à la surface d'*A. pleuropneumoniae* de sérotype 2 (figure 1.5) (Dom et *al.*, 1994).



**FIGURE 1.5 :** Photographie de fimbriae de type IV en distribution pérित्रiche à la surface d'*A. pleuropneumoniae* de sérotype 2 en microscopie électronique (Dom et *al.*, 1994).

Les fimbriae se présentent sous l'aspect d'appendices filamenteux distribués de façon pérित्रiche, d'environ 1 nm de largeur et de 100 à 300 nm de longueur. Ces protéines



sont classées parmi les fimbriae de type IV après avoir séquencé la partie N-terminal de la protéine purifiée. La sous-unité constituant ces fimbriae est une protéine de 17 kDa nommée ApfA. Par contre, bien que des fimbriae aient été démontrés à la surface d'*A. pleuropneumoniae*, leur rôle dans l'adhésion n'est pas encore clair.

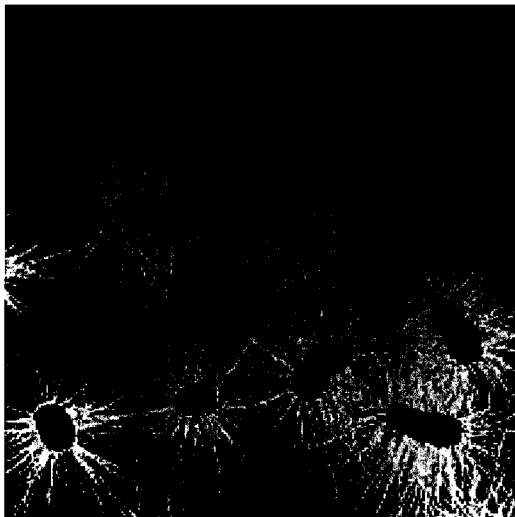
En plus d'être impliqué dans l'adhérence de la bactérie, les fimbriae augmenteraient l'interaction bactérie-bactérie. Le chapitre suivant est exclusivement concentré sur les fimbriae en générale et chez *A. pleuropneumoniae*.

## CHAPITRE II

### FIMBRIAE

#### 2.1 MORPHOLOGIE ET FONCTIONS

Depuis l'avènement de la microscopie électronique, la présence de structures filiformes, différentes des flagelles, non impliquées dans la mobilité, a été révélée à la surface de nombreuses bactéries Gram-négatives (figure 2.1). Ces structures furent appelées pili ou fimbriae. Selon la nomenclature, on peut désigner pili, les appendices qui jouent un rôle dans l'échange de matériel génétique entre deux bactéries quand elles rentrent en conjugaison (pili sexuels), tandis que les fimbriae sont impliqués dans des phénomènes d'adhésion (Soto et Hultgren, 1999; Clewell et *al.*, 1993). Les pili sont plus longs mais peu nombreux et les fimbriae sont présents en grand nombre et plus courts. Une bactérie peut en effet posséder jusqu'à 1000 fimbriae, dont le diamètre varie de 3 à 20 nm et la longueur de 0,2 à 5  $\mu\text{m}$ .



**FIGURE 2.1 :** Photographie de fimbriae d'*Escherichia coli* organisés de façon péritriche.  
([www.med.upenn.edu/camb/faculty/mv/schifferli.html](http://www.med.upenn.edu/camb/faculty/mv/schifferli.html))

## 2.2 CLASSIFICATION

La classification des fimbriae se fait en fonction de leur caractéristiques d'adhérence, de leurs propriétés physiques ou en fonction de la similarité des séquences en acides aminés de leurs pilines majeures (Hultgren et *al.*, 1996). Bien qu'il existe plusieurs classes et types de fimbriae, les mieux caractérisés et ceux ayant une présence ubiquitaire chez les pathogènes Gram-négatifs importants sont ceux de la classe 1 et de type IV.

### 2.2.1 Fimbriae de classe 1

Les pili P et les fimbriae de type 1 des souches uropathogènes de *E. coli* (*Escherichia coli*) sont les fimbriae de classe 1 les plus étudiés. Les gènes qui codent pour les pili P se regroupent dans l'opéron *pap* qui contient 11 gènes et que l'on retrouve dans le chromosome d'environ 90% des souches d'*E.coli* isolés du tractus urinaire des gens atteints de pyélonéphrite aiguë (Hultgren et *al.*, 1996 ; Kallenius et *al.*, 1981). Ces pili P vont ensuite se fixer sur des récepteurs qui contiennent du galactose au niveau des reins de l'hôte (Leffler et Svanborg-Eden, 1980). Les fimbriae de type 1 tant qu'à eux sont encodés par l'opéron *fim* chez *E.coli*, ce qui produira FimA, la piline majeure (Orndorff et Falkow, 1984). Ces fimbriae de type 1 vont se lier à des récepteurs qui contiennent du mannose au niveau de la vessie de l'hôte (Krogfelt et *al.*, 1990).

### 2.2.2 Fimbriae de type IV

Les fimbriae de type IV englobent un large éventail de fimbriae de bactéries Gram-négatives. En effet, on y retrouve une similarité de séquence en acides aminés parmi les pilines majeures. Ce groupe de fimbriae servirait à l'adhérence des bactéries aux tissus de l'hôte chez plusieurs pathogènes importants. Plusieurs études de l'adhérence de ces fimbriae ont été réalisées sur *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* et bien d'autres (Strom et Lory, 1993).

### 2.2.2.1 Adhérence et Structure

L'adhérence de certaines bactéries est entre autre due à la présence de fimbriae à la surface du pathogène. Il y a une interaction directe des sous-unités de pilines assemblées, avec un récepteur tissulaire. La partie glucidique de glycoprotéines ou de glycolipides situés dans les cellules épithéliales de l'hôte eucaryote serait le récepteur des fimbriae (Rudel et *al.*, 1995 ;Ryll et *al.*,1997). Comme il s'agit de protéines de surface membranaire et impliquées dans l'adhérence de la bactérie, les fimbriae sont des composantes intéressantes pour la fabrication d'un vaccin. En effet, la contribution des fimbriae à la virulence a été démontrée *in vivo* dans plusieurs cas. Cependant, la plupart des bactéries expriment de multiples adhésines. La contribution d'un fimbriae à la virulence est alors difficile à tester et à démontrer (Strom et Lory, 1993).

Les fimbriae se composent de plusieurs protéines : les pilines. La majorité des fimbriae de type IV sont des filaments flexibles ressemblant à des tiges d'environ 1 à 2  $\mu\text{m}$  de longueur et de 5-6 nm de diamètre où les sous-unités de pilines forment des hélices. La portion C-terminale de la piline est exposée à la surface du filament et le domaine hydrophobe N-terminal se retrouve au cœur du pilus. Ces deux domaines sont interconnectés par une région en hélice- $\alpha$  (Forest et Tainer, 1997 ; Parge et *al.*, 1995).

### 2.2.2.2 Sécrétion et caractéristiques des pilines de type IV

Une douzaine de polypeptides différents composent la machinerie d'assemblage et de sécrétion de tous les fimbriae de type IV (Fernandez et Berenguer, 2000). Tout d'abord, les pilines appartenant aux fimbriae de type IV sont synthétisées sous forme de prépilines, qui vont être ensuite clivées par une prépiline peptidase de la membrane interne. La piline est ensuite ancrée transitoirement par son domaine conservé hydrophobe localisé en N-terminal, dans la membrane interne. Ce domaine hydrophobe se retrouve immédiatement après le peptide signal. Une dizaine d'autres protéines localisées dans le cytoplasme, ainsi que la membrane interne forment un complexe avec la prépiline peptidase, où va se former l'assemblage du fimbriae (Nunn et Lory, 1991).

Par la suite, un large pore est formé dans la membrane externe par une sécrétine, à travers lequel le fimbriae est sécrété dans le milieu extra-cellulaire (Drake et *al.*, 1997).

Les prépilines de type IV possèdent un grand nombre de propriétés communes (Strom et Lory, 1993). Elles possèdent un peptide signal chargé positivement, une N-méthylation du premier acide aminé de la protéine mature, une région N-terminale hydrophobe d'environ 30 acides aminés, qui contient un résidu d'acide glutamique en position +5 et un pont disulfure intra-chaîne entre deux cystéines conservées de la région immunogénique C-terminale qui confère la stabilité à la protéine (Parge et *al.*, 1995 ; Sun et *al.*, 1997 ; Zhang et Donneberg, 1996). Cette région C-terminale contient de plus un domaine de liaison pour les cellules épithéliales (Hahn, 1997).

De plus, les prépilines de type IV sont divisées en 2 groupes. Le groupe IVA ont un peptide signal plus court d'environ 6 à 7 acides aminés, qui est clivé entre une glycine et une phénylalanine. Les pilines de type IVA débutent alors par une N-méthyl-phénylalanine. Les prépilines du groupe IVB possèdent un peptide signal plus long d'environ 13 à 30 acides aminés, qui est clivé entre une glycine et un acide aminé variable (McNamara et Donnenberg, 2000). La N-méthylation du premier résidu des pilines du type IVB n'a jusqu'à présent été déterminée que pour TcpA chez *Vibrio cholerae* (Shaw et Taylor, 1990).

#### **2.2.2.3 Fimbriae de type IV chez *A. pleuropneumoniae***

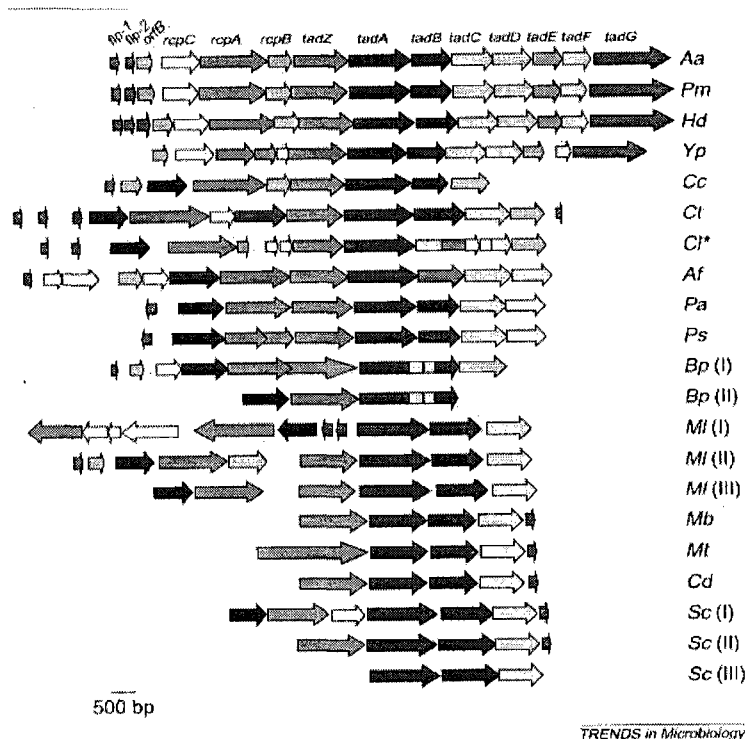
Comme il a été mentionné dans la section 1.5.3, des fimbriae ont été observés à la surface d'*A. pleuropneumoniae* de sérotype 2 (Dom et *al.*, 1994). Ces protéines font partie de la classe des fimbriae de type IV. La sous-unité constituant ces fimbriae est une protéine de 17 kDa nommée ApfA. L'analyse des 12 premiers acides aminés de cette protéine ((X)TLIELMIVIAI) démontre que ce fimbriae est identique à d'autres fimbriae de type IV (Zhang et *al.*, 2000). Les fimbriae de type IV d'*A. pleuropneumoniae* sont codés par l'opéron *apfABCD*. Le gène *apfA* code pour un polypeptide d'environ 16 kDa retrouvé chez tous les sérotypes d'*A. pleuropneumoniae*.

Le gène *apfD* est homologue à une peptidase et les gènes *apfB* et *apfC* codent pour des protéines homologues à PilB et PilC de *Pseudomonas aeruginosa* (Stevenson et al., 2003). Il a été démontré que la fabrication de ces fimbriae est hautement régulée par les conditions environnementales, malgré la présence d'un promoteur intact en amont de l'opéron. Un passage sur milieu de culture, par exemple les fait disparaître car l'activité du promoteur n'est pas suffisante pour stimuler la formation d'un fimbriae intact sous ces conditions (Zhang et al., 2000). Ces fimbriae sont donc difficiles à observer en laboratoire.

### 2.3 LE LOCUS DE FIMBRIAE *flp-rcp-tad* CHEZ *A. ACTINOMYCETEMCOMITANS*

Les fimbriae de type IV englobent un large éventail de fimbriae de bactéries Gram-négatives. Tout d'abord découvert chez *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*), le locus des gènes *flp-rcp-tad* encode lui aussi un système de sécrétion pour la synthèse et l'assemblage de fimbriae de type IV. Des gènes homologues furent découverts par la suite chez diverses autres bactéries (figure 2.2) (Kachlany et al., 2001).

Les différences dans l'expression des composants de la surface des bactéries ont un effet sur la morphologie des colonies bactériennes. Une corrélation directe entre la morphologie colonie-rugueuse et la présence de fimbriae chez *A. actinomycetemcomitans* a été établie (Haase et al., 1999). À la surface des colonies rugueuses, la présence de fimbriae péritriches abondants et rassemblés en paquets est observée, tandis que pour les colonies lisses, il n'y a peu ou pas de fimbriae. L'adhérence d'*A. actinomycetemcomitans* serait alors entre autre due à la présence de fimbriae.



**FIGURE 2.2 :** Organisation des locus *flp-rcp-tad* chez diverses bactéries (Kachlany et al., 2001)

Légende : Aa, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*; Pm, *Pasteurella multocida*; Hd, *Haemophilus ducreyi*; Yp, *Yersinia pestis*; Cc, *Caulobacter crescentus*; Ct, *Chlorobium tepidum*; Af, *Acidithiobacillus ferrooxidans*; Pa, *Pseudomonas aeruginosa*; Ps, *Pseudomonas syringae*; Bp, *Bordetella pertussis*; Ml, *Mesorhizobium loti*; Mb, *Mycobacterium bovis*; Mt, *Mycobacterium tuberculosis*; Cd, *Corynebacterium diphtheriae*; Sc, *Streptomyces coelicolor*.

### 2.3.1 La protéine FLP

En 1997, un gène associé à l'expression de fimbriae chez *A. actinomycetemcomitans* a été identifié. Il s'agit du gène *fap* pour *fimbrial-associated protein* (Ishihara et al., 1997). Maintenant appelé *flp-1* (*fimbria-like protein*), ce gène a un ORF de 228 pb qui encode une protéine de 76 acides aminés avec un poids moléculaire calculé de 7,970 kDa. La protéine mature, sans le peptide signal, possède un poids moléculaire de 5,090 kDa. Des séquences promotrices à -35 (TTGCAT) et à -10 (TATAAT) précèdent le gène, qui possède un RBS (Ribosome Binding Site) : AGGAG. On retrouve de plus une

séquence inversée répétée de 27 pb située après le gène qui pourrait constituer une séquence de terminaison. La microscopie électronique a permis de localiser Flp-1 au niveau des fimbriae. Ces fimbriae sont arrangés parallèlement et ont un diamètre de 5 à 7 nm, formant ainsi les fibrilles. Leurs sous-unités sont arrangées en hélices similaires à celles des fimbriae de type IV (Kachlany et *al.*, 2001).

Le gène *flp-2*, immédiatement localisé en aval du gène *flp-1*, serait un deuxième allèle du gène *flp*. Il est commun pour le génome bactérien de contenir plusieurs allèles du gène *flp*. La duplication et la divergence des gènes *flp* chez les bactéries doivent être importante pour la diversification des propriétés de colonisation de ces organismes. Le gène *flp-1* d'*A. actinomycetemcomitans* possède cependant plus d'homologie avec le gène *flp-1* de *P. multocida* qu'avec le gène *flp-2* d'*A. actinomycetemcomitans*. La signification du gène *flp-2* n'est pas encore connue mais certains travaux suggèrent qu'il ne serait pas exprimé (Kachlany et *al.*, 2001).

La mutation du gène *flp-1* à l'aide d'un transposon démontre un arrêt de la production des fibrilles et entraîne la production de mutants qui n'adhèrent plus aux surfaces (Kachlany et *al.*, 2001). De plus, selon Ishihara et *al.* (1997), un IgG dirigé contre la protéine Flp inhibe l'adhérence d'*A. actinomycetemcomitans* à l'épithélium bucal de l'homme. Les fimbriae seraient alors des antigènes intéressants pour le développement de vaccin dans le but d'induire la production d'anticorps, inhibant ainsi la colonisation par ce pathogène.

### 2.3.2 Les protéines RcpA et RcpB

L'équipe de Haase et *al.* (1999) a aussi identifié deux protéines de la membrane externe qui sont uniques aux colonies de morphologie rugueuse chez *A. actinomycetemcomitans* : RcpA et RcpB. Ces protéines présentent de fortes homologies avec les protéines GspD, PulD et pIV qui font partie de la famille des sécrétines (Nouwen et *al.*, 1999). Les sécrétines sont requises pour la sécrétion extracellulaire, l'assemblage des phages filamenteux et la biogenèse des pili. Elles forment des canaux



dans la membrane externe des bactéries. Le canal formé par RcpA permet la sécrétion des fimbriae. Kachlany et *al.* (2000) suggèrent que les protéines RcpA et RcpB sont requises pour la formation des fibrilles et l'adhérence de la bactérie. En effet, les mutants avec insertions dans les gènes *rcpA* et *rcpB* n'adhèrent pas et il n'y a pas d'évidence de pili et de fibrilles à leur surface.

### 2.3.2 Les protéines Tad

Kachlany et *al.* (2000) ont également identifié un locus de 6,7 kb contenant sept gènes (*tadABCDEFG*) qui seraient requis dans l'adhérence non spécifique d'*A. actinomycetemcomitans*. Toutes les protéines sauf TadA possèdent un domaine transmembranaire. La protéine TadA se retrouve alors à la membrane interne et dans le cytoplasme. Cette protéine contient les motifs conservés caractéristique des NTPases comme VirB11, une ATPase impliquée dans le transport des macromolécules. Les auteurs suggèrent donc que l'activité ATPase de la protéine TadA est requise pour fournir de l'énergie pour l'assemblage et la sécrétion des pili Flp pour l'adhérence serrée d'*A. actinomycetemcomitans*. Ils démontrent que le gène *tad* est essentiel pour la colonisation et la pathogenèse de la bactérie. De plus, l'occurrence de gènes similaires chez plusieurs autres organismes indique que ce gène aurait une fonction importante.

## CHAPITRE III

### PROBLÉMATIQUE, HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE RECHERCHE

#### 3.1 PROBLÉMATIQUE

La diversité des mécanismes utilisés par *A. pleuropneumoniae* pour induire la maladie chez l'hôte est responsable des difficultés rencontrées pour la mise au point de traitements préventifs efficaces. Dans le but de survivre dans les poumons d'un porc, *A. pleuropneumoniae* doit mettre en œuvre une série de mécanismes afin de diminuer ou de contourner les défenses immunitaires de l'hôte. Le pouvoir pathogène d'*A. pleuropneumoniae* repose en effet sur de nombreux facteurs de virulence. Plusieurs groupes de recherche localisés à travers le monde étudient les facteurs de virulence de cette bactérie, mais un grand nombre de ces facteurs sont encore inconnus. À ce jour, aucun vaccin n'est efficace contre l'ensemble des sérotypes d'*A. pleuropneumoniae*, démontrant ainsi le manque de connaissances des protéines antigéniques essentielles à la survie de la bactérie. C'est pourquoi la prévention par la vaccination demande une plus grande connaissance des facteurs de virulence et des protéines susceptibles de stimuler le système immunitaire porcin.

#### 3.2 HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

Les vaccins composés de protéines antigéniques actuels comportent trois toxines Apx et une protéine de la membrane externe ou plusieurs antigènes capsulaires. Ils permettent de réduire l'intensité des signes cliniques, de réduire la sévérité des lésions, d'augmenter les taux de croissance et de réduire le coût des traitements. Cependant, ces vaccins n'empêchent pas toujours la colonisation des voies respiratoires puisque, selon une étude, 12 animaux vaccinés sur 18 hébergent *A. pleuropneumoniae* (Chiers K et al., 1998). L'adhésion aux cellules épithéliales des bronchioles terminales et aux alvéoles permet à la bactérie de sécréter ces toxines directement à la surface membranaire des cellules de l'hôte, provoquant la destruction des cellules de l'hôte même en présence des anticorps induits lors de la vaccination (F. Haesebrouck et al., 2004). S'il était possible

d'induire la production d'anticorps contre des protéines d'adhésion de la bactérie, on bloquerait ainsi l'attachement de la bactérie avec les cellules de l'hôte. C'est pourquoi il est important d'étudier plus en détails de nouveaux gènes codant pour des protéines de surface membranaire tels que les gènes *flp-1* et *flp-2*, qui seraient impliqués dans l'adhésion de la bactérie aux cellules de l'hôte.

Nancy Perreault, étudiante à la maîtrise dans le laboratoire du Dr Marc Sirois de l'Université du Québec à Trois-Rivières, a construit une banque génomique d'*A. pleuropneumoniae* de sérotype 1 dans un plasmide contenant le gène tronqué de la phosphatase alcaline (Perreault N, 2003). La fusion de protéines avec la phosphatase alcaline est un outil d'identification des protéines exposées à la surface de la bactérie ou sécrétées dans le milieu extérieur, donc de protéines susceptibles d'induire une réponse immunitaire chez l'animal infecté (Ward J. et al., 2001). Cette technique lui a permis d'identifier le gène *rcpA* chez *A. pleuropneumoniae*, par homologie de séquence avec *A. actinomycetemcomitans*. Ce gène fait partie du locus *flp-rcp-tad*, dont la séquence se retrouve chez *A. pleuropneumoniae*.

Comme il a été mentionné à la section 2.3, le locus *flp-rcp-tad* encode un système de sécrétion pour la synthèse et l'assemblage de fimbriae de type IV, qui est retrouvé chez diverses autres bactéries (Kachlany et al., 2001). Chez *A. actinomycetemcomitans*, la protéine Flp-1 est impliquée dans l'adhésion de la bactérie, tandis que la signification du gène *flp-2* n'est pas encore connue (Kachlany et al., 2001). L'hypothèse est que les gènes *flp1* et *flp2* retrouvés chez *A. pleuropneumoniae* produiraient des protéines antigéniques qui pourraient être utilisées pour la fabrication d'un vaccin. Ces protéines pourraient aussi être impliquées dans l'adhérence de la bactérie aux cellules pulmonaires du porc, donc importantes dans la virulence de la bactérie.

L'objectif à court terme du projet de recherche actuel serait de cloner chacun des gènes *flp1* et *flp2* retrouvés chez *A. pleuropneumoniae* souche 4074, de faire la production de ces protéines ainsi que les purifier dans le but de vérifier leur pouvoir immunogène chez le porc. Ce projet de recherche sur le clonage et la caractérisation des gènes qui codent

pour un nouveau fimbriae de type IV (FLP), nous permettrait de mieux connaître ces gènes, nous menant peut-être par la suite à l'élaboration d'un vaccin efficace contre tous les sérotypes d'*A. pleuropneumoniae*.

### **3.3 DESCRIPTION DES CHAPITRES SUIVANTS**

Le chapitre IV correspond au corps de mémoire présenté sous forme d'article scientifique. Le résumé en langue française de ce dernier est présenté au début de ce document. Au chapitre V, une discussion sur les différents résultats obtenus est présentée. Finalement, une conclusion générale de l'ensemble des éléments présentés dans ce mémoire est effectuée au chapitre VI.

**CHAPITRE IV**  
**ARTICLE SCIENTIFIQUE**

**4.1 Cloning And Characterisation Of Genes Encoding New Type IV Fimbriae (Flp)  
In *Actinobacillus pleuropneumoniae***

Annet Lavallée, Nancy Perreault and Marc Sirois\*

Laboratoire de recherche en génomique microbienne

Département de Chimie-Biologie

Université du Québec à Trois-Rivières

Trois-Rivières, Québec

Canada, G9A 5H7

\*Corresponding author

Marc Sirois

Département de Chimie-Biologie

Université du Québec à Trois-Rivières

3351 boul des Forges

Trois-Rivières, Québec, Canada

G9A 5H7

Phone : 819-376-5011 ext 3999

Fax : 819-376-5084

Email : [siroism@uqtr.ca](mailto:siroism@uqtr.ca)

## 4.2 ABSTRACT

*Actinobacillus pleuropneumoniae* is an important primary pathogen in pigs, which causes a highly contagious pleuropneumonia. Adherence of this bacteria to epithelial cells is the initial step in the colonisation of the host. Fimbriae are a common means by which pathogenic bacteria colonise mucous membranes. They are also usually highly antigenic and have been used successfully as vaccines against a range of bacterial pathogens. Our laboratory identified a 14-gene cluster in *A. pleuropneumoniae* serotype 1, composed of the *flp-rcp-tad* genes. The fimbriae Flp1 is required for tight adherence of *A. actinomycetemcomitans* to surface. For this reason, this protein can be useful as a candidate target for *A. pleuropneumoniae* vaccination; the Flp2 protein could be also useful as a candidate target for *A. pleuropneumoniae* vaccination. To verify their potential as vaccine candidates, genes encoding the Flp1 and Flp2 from a serotype 1 isolate of *A. pleuropneumoniae* were PCR amplified from genomic DNA template and cloned into a pQE30 prokaryotic expression vector. *Escherichia coli* M15 (pREP4) competent cells were transformed with each construct followed by the induction of protein expression by the addition of IPTG. Bands corresponding to the predicted sizes were identified on SDS-PAGE gels. Serum from convalescent-phase pigs naturally infected with *A. pleuropneumoniae* serotype 1 reacted with the Flp1 protein. This result indicates that this recombinant protein can induce immunological responses and might be useful as candidate targets for *A. pleuropneumoniae* vaccination.

Keyword: *Actinobacillus pleuropneumoniae*; fimbriae; *flp1*; *flp2*; virulence factors; antigenic proteins; recombinant proteins.

### 4.3 INTRODUCTION

*Actinobacillus pleuropneumoniae* is the causative agent of porcine pleuropneumonia, a highly contagious disease distributed worldwide and resulting in substantial losses in the pig industry [1]. This gram negative bacterium is a member of the *Pasteurellaceae* family, which consist of the genus *Actinobacillus*, *Haemophilus*, *Pasteurella*, and the most recent *Mannheimia*. Several bacterial components have been suggested as important virulence factors of *A. pleuropneumoniae*, including capsule, lipopolysaccharides (LPS), the haemolytic and cytotoxic Apx toxins, transferrin-binding proteins (Tbp1 and Tbp2) and various hydrolytic proteases. The pathogenesis of porcine pleuropneumonia is complex, related to its multifactorial virulence, and therefore still not completely elucidated.

In general, adherence of bacteria to epithelial cells is the initial step in the colonisation of the host and often involves specific interaction between bacterial adhesins and complementary receptors on host cells [2]. Adherence enables colonization to occur and frequently allows the bacterium to exert its pathogenic effects. In previous studies, it was shown that *A. pleuropneumoniae* adheres to the epithelium of the alveoli or the cilia of the terminal bronchioli of experimentally infected pigs [3]. It has also been shown that *A. pleuropneumoniae* adheres in vitro to porcine tracheal rings [4], frozen lung and trachea sections [5], and mucus of the respiratory tract [6]. Only few adhesion factors belonging to *A. pleuropneumoniae* have been described. Lipopolysaccharides seem to be involved in the in vitro adhesion to porcine tracheal rings [4] and type 4 fimbriae have been localized on the surface of *A. pleuropneumoniae* [7]. Fimbriae are a common matter by which pathogenic bacteria colonize host mucous membranes. They are also

usually highly antigenic and have been used successfully as vaccines against a range of bacterial pathogens [8].

Recently, a potentially novel class of fimbriae was identified in both *Caulobacter crescentus* [9] and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* [10]. Fimbriae purified from both organisms were shown to be comprised of a major subunit with an apparent molecular mass of 5 to 6 kDa. The amino acid sequences of these small proteins had some similarity to known type IV prepilin proteins, and the *A. actinomycetemcomitans* protein was designated Flp (for fimbriae-like-protein). The major subunits of the *A. actinomycetemcomitans* fimbriae are encoded by *flp-1* and *flp-2*, the first two open reading frames (ORFs) of the operon [10].

To detect putative exported proteins from the swine bacterial pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae* (type strain 4074, serotype 1), our laboratory used the *phoA* gene fusion strategy and identified a gene cluster that encoded protein products with significant homology to the Flp protein products of *A. actinomycetemcomitans*.

In this study, we identified and completely sequenced a 14-gene cluster in *A. pleuropneumoniae*, composed of the *flp-rcp-tad* genes, that was shown to encode products with homology to proteins involved in the formation of surface appendages in other bacteria, including *A. actinomycetemcomitans* [10] and *C. crescentus* [9]. Genes encoding the Flp1 and Flp2 proteins were amplified by PCR and cloned into expression vector for the production of the two recombinant proteins. We also studied the immunogenicity of the Flp1 and Flp2 proteins by Immunoblot to verify their potential as candidate targets for *A. pleuropneumoniae* vaccination.



## 4.4 MATERIALS AND METHODS

### 4.4.1 Bacterial strains, plasmids, and growth conditions

Bacterial strains, plasmids, and primers used in this work are listed in table 1. *A. pleuropneumoniae* type strain 4074 (serotype 1) was grown on TSA (Tryptic Soy Agar, Difco) supplemented with Nicotinamide Adenine Dinucleotide [100 µg/ml]. *Escherichia coli* M15 containing the repressor (pREP4) plasmid was used for the expression of recombinant proteins. This strain was purchased from Qiagen and cultured in Luria-Bertani medium supplemented with the appropriate antibiotic (kanamycine [25 µg/ml]). Plasmid vectors pQE-30 UA containing ampicillin resistance gene was used for direct cloning of PCR products into an expression vector. This vector was purchase from Qiagen.

### 4.4.2 DNA sequencing of *A. pleuropneumoniae* *flp-rcp-tad* genes

The complete *rcpA* gene in *A. pleuropneumoniae* has been cloned and sequenced. This DNA insert served as matrix for the construction of a probe to clone the complete *flp-rcp-tad* genes in an *A. pleuropneumoniae* bacteriophage DNA library. Sequencing and characterization of the full-length cluster in *A. pleuropneumoniae* was done. Double-stranded plasmid DNA was sequenced using ABI Prism Dye Terminator Cycle sequencing (Applied Biosystem) at University Laval.

Nucleotide sequences of the of 14-gene cluster in *A. pleuropneumoniae*, composed of the *flp-rcp-tad* genes, was compared with other bacteria using the BLAST alignment program to search GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/unfinishedgenome.html>).

#### 4.4.3 Manipulation of DNA

*Taq* polymerase was purchased from New England Biolabs. Chromosomal DNA of *A. pleuropneumoniae* was prepared using the Aquapure Kit (Bio-Rad Laboratories) and plasmid DNA using the Miniprep Kit (Qiagen). PCR, transformation and gel electrophoresis were done by standard procedures [11].

#### 4.4.4 Cloning of *A. pleuropneumoniae flp1* and *flp2* gene and expression of the recombinant proteins in *E. coli*

For cloning of the *A. pleuropneumoniae flp1* and *flp2* gene, primers Flp-F and Flp1-R for the *flp1* gene and primers Flp2-F and Flp-R for the *flp2* gene, were constructed. The PCR products were generated with these primers using *A. pleuropneumoniae* serotype 1 chromosomal DNA as a template. These PCR products were cloned into pQE30-UA vector (Qiagen) and used according to manufacturer's instructions. The resulting plasmid were transformed into *E. coli* M15 (pREP4) cells.

Colonies obtained after counterselection on Luria-Bertani medium supplemented with the appropriate antibiotic (kanamycine [25 µg/ml] and ampicilline [100 µg/ml]) were tested by PCR using primers pQE-rev and Flp-F for the pQE30-UA/*flp1* vector and primers pQE-rev and Flp2-F for the pQE30-UA/*flp2* vector (Table 1). Colonies with the characteristic PCR profile were used for the production of proteins. *E. coli* transformants were induced to form aggregates by the addition of isopropylthiogalactoside (IPTG, 1 mM final concentration). *E. coli* M15 (pREP4) whole-cell lysates containing *A. pleuropneumoniae* recombinants proteins Flp1 (rFlp1) and Flp2 (rFlp2) were analyzed

by discontinuous sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (15 % acrylamide).

#### **4.4.5 Immunoblot analysis of *A.pleuropneumoniae* Flp1 and Flp2 proteins**

*E.coli* M15 (pPREP4) whole-cell lysates containing *A.pleuropneumoniae* rFlp1 and rFlp2 were analyzed using a Protean II Minigel system (Bio-Rad Laboratories) as described previously (11). Serum from convalescent-phase pigs naturally infected with *A. pleuropneumoniae* serotype 1 were used and anti-pig IgG alkaline phosphatase (Sigma) in Western blots against rFlp-1 and rFlp-2. Blots were developed with a substrate containing 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP) and nitroblue tetrazolium.

### **4.5 RESULTS**

#### **4.5.1 Identification and sequencing of a distinct *flp* subfamily of prepilin genes in *A. pleuropneumoniae* serotype 1**

To detect putative exported proteins from the swine bacterial pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae* (type strain 4074, serotype 1), our laboratory used the *phoA* gene fusion strategy and identified the gene cluster composed of the *flp-rcp-tad* genes, that was shown to encode products with homology to proteins involved in the formation of surface appendages in other bacteria, including *A. actinomycetemcomitans* [10] and *C. crescentus* [9]. We found that the organisation of all *flp-rcp-tad* genes of *A.pleuropneumoniae* serotype 1 is similar to those in the *flp-rcp-tad* locus of *A. actinomycetemcomitans* (Fig 4.1). Sequencing and characterization of the full-length

cluster in *A. pleuropneumoniae* was done but in this paper we have been studying the *flp-1* and *flp-2* genes.

The *flp-1* gene consist of an ORF of 228 pb coding for a protein of 77 amino acids with a predicted molecular mass of 8,5 Da (Fig 4.2). It was preceded by a RBS consensus sequence AGGAGA 7 pb upstream of the ATG codon. The first 26 amino acids have the characteristics of a signal peptide and accordingly Flp1 is predicted to be localized in the bacterial outer membrane. The predicted Flp1 mature peptide have 51 amino acids. Consensus promoter sequences at -35 (TTGTT) and -10 (TTAAAT) have been identified 41 and 19 nucleotides upstream of the ATG codon. There are 16 bp that separate these two promoters. No consensus promoter sequences or termination sequence have been identified downstream the *flp-1* ORF. The *flp-2* gene consist of an ORF of 198 pb coding for a protein of 65 amino acids with a predicted molecular mass of 7,26 Da (Fig 4.3). The first 15 amino acids have the characteristics of a signal peptide that is cleaved upon export of the Flp2 protein from the bacterial cell. The predicted Flp2 mature peptide has 50 amino acids.

*A. pleuropneumoniae* serotype 1 Flp1 and Flp2 proteins can be assigning to the type IVB Flp prepilins family. In fact, the genes of the type IVB Flp prepilins family have several distinguishing features. First, the predicted polypeptide products of all *flp* subfamily genes range from 50 to 80 amino acids, whereas other type IV prepilins generally exceed 120 amino acids. *A. pleuropneumoniae* Flp1 protein has 77 amino acids and *A. pleuropneumoniae* Flp2 protein, 65 amino acids. In addition, alignment of the *flp* subfamily polypeptide products revealed a shared motif (Flp motif) at the N-terminus of

the predicted mature peptide. This motif is characterized by adjacent glutamate and tyrosine residues in its centre, and it occurs within a stretch of  $\approx 20$  hydrophobic, non-polar, aliphatic amino acids. *A. pleuropneumoniae* Flp1 and Flp2 proteins have this shared motif characterized by adjacent glutamate and tyrosine residues (Fig 4.4). Thirdly, the predicted polypeptides usually contain a phenylalanine residue close to the middle of their hydrophilic C-terminal domains and the hydrophilic C-terminal domains of the *A. pleuropneumoniae* Flp1 and Flp2 proteins contain this phenylalanine residue. Comparison of the deduced amino acid sequence of *A. pleuropneumoniae* serotype 1 *flp-1* gene revealed homology (35,1% identities) to the *flp-2* gene from *A. pleuropneumoniae* serotype 1.

#### 4.5.2 Production of recombinant Flp1 and Flp2 proteins

Wild-type *flp1* and *flp2* genes were cloned into pQE30-UA and expressed in *E. coli* M15 (pREP4). The pQE-30 UA expression vector is designed for direct cloning of PCR products. UA-cloning technology exploits the fact that *Taq* DNA polymerase add a 3'-end A overhang to PCR products. This allows the direct insertion of such PCR products into the prelinearized pQE-30 UA vector, which has a U overhang on each 3' end. The plasmid *flp1*/pQE30UA was 3660 bp long and plasmid *flp2*/pQE30UA, 3657 pb long. Therefore, the PCR products could be cloned in vector in the wrong direction. To eliminate this probability, a PCR was done using primers pQE-rev and Flp-F for the pQE30-UA/*flp1* vector and primers pQE-rev and Flp2-F for the pQE30-UA/*flp2* vector. Primers pQE-rev were used to prime the plasmid pQE30-UA. The correct PCR profile show bands of 156 bp for pQE30-UA/*flp1* and 153 bp for pQE30-UA/*flp2*. His-tag

sequence was added upstream of the recombinant proteins and the predicted molecular sizes were 10.714 kDa for the rFlp1 proteins and 9.456 kDa for the rFlp2 proteins. After induction with IPTG, recombinant proteins from whole-cell lysates were analysed by 15% acrylamide SDS-PAGE to verify the presence of the proteins (Fig 4.5). The recombinant proteins Flp1 and Flp2 migrated with an apparent molecular weight of ~5 kDa, smaller than the predicted sizes. The predicted Flp1 protein had 35.1% identity with the Flp2 protein of *A. pleuropneumoniae*.

#### 4.4.3 Immunological detection of rFlp1 and rFlp2 expression

*E.coli* M15 (pREP4) whole-cell lysates containing *A. pleuropneumoniae* rFlp1 and rFlp2 with IPTG induction and without IPTG induction for a negative controls, were analyzed by western blotting. A serum pool from convalescent-phase pigs naturally infected with *A. pleuropneumoniae* serotype 1 was used. On whole-cell lysates of *E.coli* M15 (pREP4) carrying recombinant *A. pleuropneumoniae* proteins Flp1 with IPTG induction, western-blot analysis demonstrated the presence of an calculated 5-kDa protein that was absent from *E.coli* M15 (pREP4) carrying recombinant *A. pleuropneumoniae* proteins Flp1 negative control (without IPTG induction) (Fig 4.4). Western-blot analysis and comparison on whole-cell lysates of *E.coli* M15 (pREP4) carrying recombinant *A. pleuropneumoniae* proteins Flp2 with IPTG induction, there was no distinction compare to the *E.coli* M15 (pREP4) carrying recombinant *A. pleuropneumoniae* proteins Flp2 negative control (without IPTG induction) (Fig 4.6).

## 4.6 DISCUSSION

Colonization of target specific tissue by bacterial pathogens is an essential first step in pathogenesis [12]. A thorough understanding of this stage of host-parasite interaction is critical for the development of therapeutic strategies [13]. In our laboratory, we identified a 14-gene cluster in *A. pleuropneumoniae*, composed of the *flp-rcp-tad* genes, that was shown to encode products with homology to proteins involved in the formation of surface appendages in other bacteria, including *A. actinomycetemcomitans* [10] and *C. crescentus* [9]. RcpA is an outer membrane protein potentially antigenic, while TadG would instead be found in the inner membrane [14]. In *A. actinomycetemcomitans*, the Flp1 pre-pilin protein is encoded by *flp1*, the first gene in a cluster of 14 genes required for the synthesis and assembly of adhesive fimbriae [15]. The second gene in this cluster, *flp2*, encodes a homologue of Flp1. The function of *flp2* is unknown, and preliminary studies suggest that the gene might not be expressed. However, when the upstream region of *flp1*, containing a Shine-Dalgarno sequence, was fused to *flp2*, the protein was expressed in *E.coli* [16].

As expected, we were able to produce the recombinant proteins Flp1 and Flp2 from *A. pleuropneumoniae* serotype 1 in the expression vector pQE30-UA. However, the predicted molecular mass of the proteins were smaller than the observed molecular mass. The Flp1 and Flp2 proteins must have an N-terminal signal sequence, which is cleaved during translocation across the bacterial inner membrane [19]. We supposed that the Flp1 and Flp2 proteins losted their signal peptide and the His tag sequence, that was added upstream the recombinant proteins, by an unknown cleavage mechanism existing in *E.coli*. The molecular mass of the Flp1 protein without peptide signal and

His-Tag is 5.554 kDa and 5.372 kDa for Flp2. These modifications may explain the difference between the estimated molecular mass (~5 kDa) of Flp1 and Flp2 by SDS-PAGE analysis and the calculated molecular mass from its amino acid sequence (10.714 kDa for Flp1 and 9.456 kDa for Flp2). We also attempted to purify the proteins with the Ni-NTA technology but did not succeed. These results support and extend our previous findings that showed the absence of the signal peptides and consequently the His-tag sequence. Analysis with His-tagged Flp1 and Flp2 and anti-His antibody should be done to determine if these proteins are His-tagged. We could also move tag to the opposite end of the proteins.

*E.coli* M15 (pPREP4) whole-cell lysates containing *A.pleuropneumoniae* rFlp1 and rFlp2 were analyzed by Immunoblotting. A serum pool from convalescent-phase pigs naturally infected with *A. pleuropneumoniae* serotype 1 was used: the serum detected rFlp1. The previous results showed that the Flp1 protein could be used to develop antibodies against the pathogen: Flp1 protein is immunogenic antigenic and could be successfully used for the development of effective vaccines. However, serum from *A.pleuropneumoniae* serotype 1 infected pigs did not detect rFlp2 in Immunoblot assays: this could be due to differences in the conformation of the Flp2 molecules. For example, antibodies generated against whole fimbriae during infection with *A.pleuropneumoniae* may not recognize denatured monomeric Flp2 in Immunoblot. It is also possible that the serum from convalescent-phase pigs naturally infected with *A. pleuropneumoniae* serotype 1 we used did not produce antibodies against Flp2 in a particular (experimental) context of infection.



The demonstration of the presence of *flp1* and *flp2* mRNA in various conditions is underway: it is probable that *flp1* and *flp2* expression is modified in different contexts. It could be interesting to study the effect of bronchoalveolar lavage fluid (BALF) on the expression of these genes: this latter *ex vivo* model was used in previous studies [17]. In fact, it was demonstrated that the concentration of some proteins of *A. pleuropneumoniae* were significantly increased in BALF but not in serum of infected pigs [18].

The reason why *A. pleuropneumoniae* has the genetic information to produce two very similar Flp proteins is not clear. *Flp*-encoding genomes commonly possess more than one closely linked *flp* allele. Indeed, the genomes of *Haemophilus ducreyi*, *Pasteurella multocida* and *Chlorobium tepidum* contain three or more clustered *flp* alleles [15]. Duplicated *flp* prepilin genes may play slightly different structural roles, be expressed in different contexts, act as regulatory elements or merely increase production of pilin subunits by increasing gene dosage. The multiple alleles of *flp* may allow interactions of cells with different surfaces and some bacterial pathogens may differentially express *flp* alleles for antigenic variation or host adaptation. Because *flp* homologues are found in several disease-causing bacteria, understanding Flp structure, function and phylogeny may provide exciting possibilities for the development of vaccines and chemotherapeutic interventions that inhibit the binding of pathogens to host surfaces.

#### 4.7 CONCLUSIONS

Expression of fimbriae is believed to be important for the initial stages of bacterial infection [20]. Type IV fimbriae have been shown to increase bacteria-bacteria interactions and to promote bacterial adherence and colonization, thereby facilitating the progress of bacterial infection [20]. It has been well established that *A.pleuropneumoniae* attaches to the epithelial cells of the host respiratory tract [3]. With the identification of new type IV fimbriae (Flp), it will now be possible to study the role of these structures in the development of pleuropneumonia and in the adherence and colonization of *A.pleuropneumoniae* to host tissue.

#### 4.8 REFERENCES

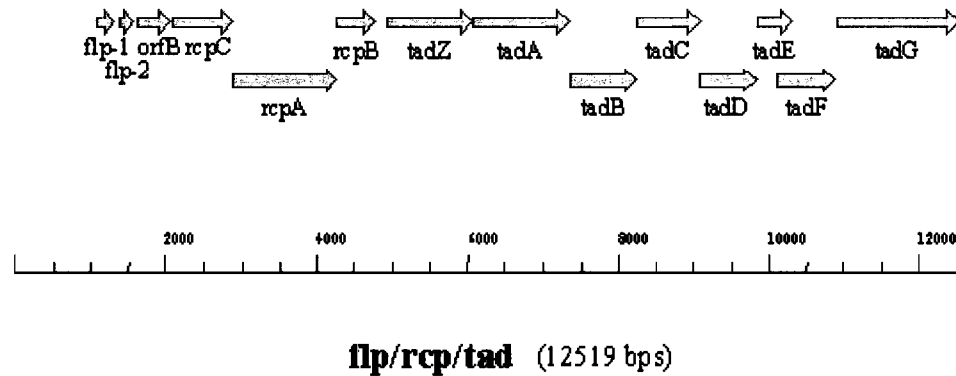
1. Nicolet, J. 1992. *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In: Leman, A.D., Straw, B.E., Mengeling, W.L., D'Allaire, S., Taylor, D.J. (Eds.), Diseases of Swine. Iowa State University Press, Ames, IA, pp. 401–408.
2. Woods, D.E., 1988. Bacterial colonization of the respiratory tract: clinical significance. In: Pennington, J.E. (Ed.) Respiratory Infections: Diagnosis and Management. Raven, New York, pp.34-40.
3. Dom, P., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., Charlier, G., 1994. In vivo association of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 with the respiratory epithelium of pigs. Infect. Immun. 62, 1262-1267.
4. Belanger, M., Dubreuil, D., Harel, J., Girard, C., Jacques, M., 1990. Role of lipopolysaccharides in adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to porcine tracheal rings. Infect. Immun. 58, 3523-3530.
5. Paradis, S.E., Dubreuil, J.D., Gottschalk, M., Archambault, M., Jacques, M., 1999. Inhibition of adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to porcine respiratory tract cells by monoclonal antibodies directed against LPS and partial characterization of the LPS receptors. Curr. Microbiol. 39, 313-320.
6. Belanger, M., Dubreuil, D., Jacques, M., 1994. Proteins found within porcine respiratory tract secretions bind lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Infect. Immun. 62, 868-873.
7. Zhang, Y., Tennent, J.M., Ingham, A., Beddome, G., Prideaux, C., Michalski, W.P., 2000. Identification of type 4 fimbriae in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. FEMS Microbiol. Lett. 189: 15-18.

8. Stewart, D.J., Elleman, T.C., 1987. A *Bacteroides nodosus* pili vaccine produced by recombinant DNA for the prevention and treatment of foot-rot in sheep. Aust. Vet. J. 64, 79-81
9. Skerker, J.M., and L. Shapiro. 2000. Identification and cell cycle control of a novel pilus system in *Caulobacter crescentus*. EMBO J. 19:3223-3234.
10. Kachlany, S.C., P.J. Planet, M.K. Bhattacharjee, E. Kollia, R. DeSalle, D.H. Fine, and D.H. Figurski. 2000. Nonspecific adherence by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* requires genes widespread in Bacteria and Archaea. J. Bacteriol. 182:6169-6176.
11. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
12. Finlay, B.B., and Falkow, S. (1997) Common themes in microbial pathogenicity revisited. Microbiol Mol Biol Rev 61: 136-167
13. Witzemann, T.M., Adamou, J.E., and Langermann, S. (1999) Adhesins as targets for vaccine development. Emerg Infect Dis 5: 395-403.
14. Skerker, J.M., and Shapiro, L. (2000) Identification and cell cycle control of a novel pilus system in *Caulobacter crescentus*. EMBO J 19: 3223-3234.
15. Kachlany SC, Planet PJ, Desalle R, Fine DH, Figurski DH, Kaplan JB. 2001. flp-1, the first representative of a new pilin gene subfamily, is required for non-specific adherence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Mol Microbiol: 40: 542-554.

16. Kachlany SC, Planet PJ, Desalle TZ, Fine DH, Figurski DH. 2001. Genes for tight adherence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: from plaque to plague to pond scum. *Trends Microbiol.* 9: 429-437
17. Jacobsen ID, Meens J, Baltes N, Gerlach GF. 2005. Differential expression of non-cytoplasmic *Actinobacillus pleuropneumoniae* proteins induced by addition of bronchoalveolar lavage fluid. *Vet Microbiol.* 30;109(3-4):245-56.
18. Hennig-Pauka I, Jacobsen I, Blecha F, Waldmann KH, Gerlach GF. 2006. Differential proteomic analysis reveals increased cathelicidin expression in porcine bronchoalveolar lavage fluid after an *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection. *Vet Res.* 37(1):75-87.
19. Pugsley, A. P. 1993. The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* 57:50-108
20. Hoepelman, A.I. and Tuomanen, E.I. 1992. Consequences of microbial attachment: directing host cell functions with adhesins. *Infect. Immun.* 60, 1729-1733.

## 4.9 FIGURES

**Figure 4.1 :**Arrangement of genes in the *flp-rcp-tad* region of the *A. pleuropneumoniae* serotype 1 strain 4074. Shown are genes and ORFs in the 12 519 kb region flanked by *flp-1* and *tadG*.



**Figure 4.2 :** *flp-1* gene and Flp1 protein sequence in *A. pleuropneumoniae* serotype 1 strain 4074 (signal peptide et protein)

```

1  ATGTTATCTA ACTTAACAAC CAAAGCATAT ATTTTCAGTAA CCGAAGGTAT
   M L S N L T T K A Y I S V T E G
51  CCGTCGTTTT AAAGAAAACC AACAAGGTGT AACTGCAATC GAATACGGTT
   I R R F K E N Q Q G V T A I E Y G
101 TGATCGCTGT AGCGGTAGCC ATTCTAATTG TTGCGGTGTT CTATAACGAC
   L I A I A V A I L I V A V F Y N D
151 AAAGGTTTCA TTCAACAATT AAAATTAAAA TTCGATCAAC TTACAAAAC
   K G F I Q Q L K L K F D Q L T K
201 AGTACAAGGT GCAAATGGCT TAACTAAGCA ATAG
   T V Q G A N G L T K Q -

```

**Figure 4.3 :** *flp-2* gene and Flp2 protein sequence in *A. pleuropneumoniae* serotype 1 strain 4074 (signal peptide et protein)

```

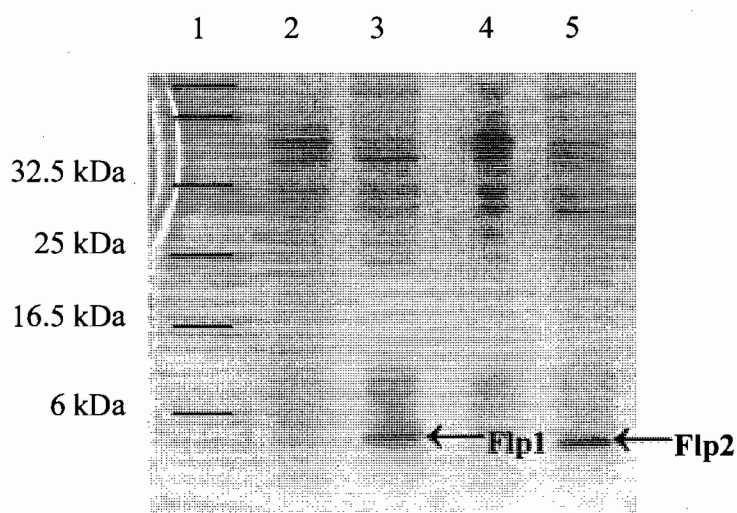
1  ATGAAAATAA AAAAAGTTTT ACAGTTTTAT CGGCAACAAC AAGGTATTAC
   M K I K K L L Q F Y R Q Q Q G I
51  TTCTCTTGAA TACGGCTTAG TTGCCGTTGC GATGGCGGTA TTTGTTGTTG
   T S L E Y G L V A V A M A V F V V
101 CCGTTTTATA CGGTGACTCA AGTTTCACGG ATGAAACGTT AAGAAAATTT
   A V L Y G D S S F T D E T L R K F
151 AAACAGCTCT CCGAGCTAGT CACTTCGGCA CTGTTAAGCA CGTCTTAG
   K Q L S E L V T S A L L S T S -

```

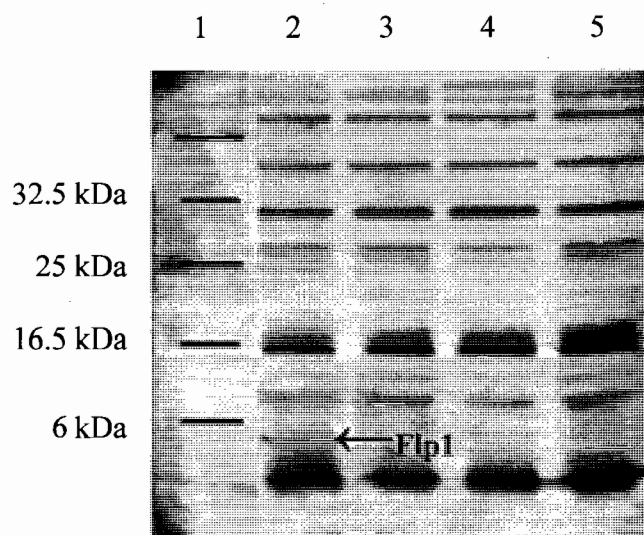
**Figure 4.4 : Alignment of the predicted products of *flp* subfamily members. Three-domain structure is shown by coloured boxes (yellow, leader peptide; blue, hydrophobic region; red, variable C-terminus). The grey box shows the area of highest conservation between Flp proteins. Note the absolute conservation of the adjacent glutamate and tyrosine residues . Within the C-terminal region, a phenylalanine residue is conserved in all but one example (*C. limicola* Flp1).**

Leader peptide	Hydrophobic Region	C-terminal region
<i>A. pleuropneumoniae</i> serotype1 Flp1	MLSNLTTKAYISVTEGIRRFKENQQG	TAIEYGLI
<i>A. pleuropneumoniae</i> serotype1 Flp2	MKIKKLLQFYRQQQG	TSLEYGLV
<i>A. actinomicetemcomitans</i> Flp1	MLNTLTTKAYIKASEAIRSFRENQAG	TAIEYGLI
<i>A. actinomicetemcomitans</i> Flp2	MMDLLDYFYRQVVFESYKFYRNROG	TSVEYGLI
<i>P. multocida</i> Flp1	MFSKLTTQAYIAVTESIRNFKKDERG	TAIEYGLI
<i>P. multocida</i> Flp2	MILFFCFFKSQKG	TSIEYGLI
<i>C. crescentus</i> Flp	MTKFVTRFLKDESG	TAIEYGLI
<i>H. ducreyi</i> Flp1	MLSVLMTQAYISATESLRISIQRFRKNQQG	TAIEYGLI
<i>H. ducreyi</i> Flp2	MLSVLMTQAYISATESLRISIQRFRKNQQG	TAIEYGLI
<i>H. ducreyi</i> Flp3	MLITIIITKPYLSMKETLISWFNCFKINQKG	TAIEYGLI
<i>S. meliloti</i> Flp	MKDRTMKNLLARFARNESG	TAIEYGLI
<i>B. japonicum</i> Flp	MKNTLKNFLADERG	TAIEYGLI
<i>B. bronchiseptica</i> Flp	MLTQLKNFWHDEEG	TAIEYGLI
<i>B. pertussis</i> Flp	MLTQLKNFWRDEEG	TAIEYGLI
<i>P. aeruginosa</i> Flp	MKNLTLFVYCKVRAFLADEEG	NAIEYAVI
<i>C. limicola</i> Flp1	MPNMFFAIQLAIEAMQATLDRHFDIRSQKG	IAIEYGLL
<i>C. limicola</i> Flp2	LKSQKCN	TIIEYALL

**Figure 4.5: Expression of recombinant Flp1 and Flp2 *A. pleuropneumoniae* proteins in *E.coli* M15 (pREP4).** Broad-range protein molecular mass markers are shown in lane 1. Lane 3 and 5, proteins from whole-cell lysates *E. coli* M15 (pREP4) carrying recombinant proteins Flp1(lane 3) and Flp2 (lane 5) with IPTG induction; lane 2 and 4, proteins from whole-cell lysates *E.coli* M15 (pREP4) carrying recombinant proteins Flp1(lane 2) and Flp2 (lane 4) without IPTG induction. Proteins were stained with Coomassie blue.



**Figure 4.6: Western blot analysis of fimbriae subunit Flp1 and Flp2 from *A. pleuropneumoniae* serotype 1 expressed in *E.coli* M15 (pREP4).** Broad-range protein molecular mass markers are shown in lane 1. Lane 2 and 4, proteins from whole-cell lysates *E. coli* M15 (pREP4) carrying recombinant proteins Flp1(lane 2) and Flp2 (lane 4) with IPTG induction; lane 3 and 5, proteins from whole-cell lysates *E.coli* M15 (pREP4) carrying recombinant proteins Flp1(lane 3) and Flp2 (lane 5) without IPTG induction.





## 4.10 TABLE

Table 4.1 : Strains, plasmids and primers used in this study

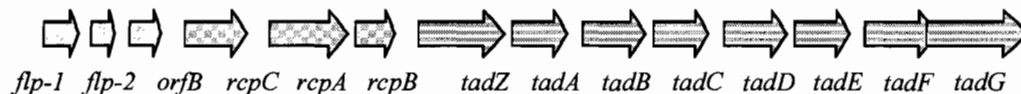
Strain, plasmid, or primer	Characteristics	Reference or source
<b>Strains</b>		
<i>E. coli</i> M15 (pREP4)	derived from <i>E. coli</i> K12 and contained repressor plasmids (pREP4)	Qiagen
<i>A. pleuropneumoniae</i> 4074	<i>A. pleuropneumoniae</i> serotype 1 strain	This work
<b>Plasmid</b>		
pQE30-UA	<i>E. coli</i> expression vector for direct cloning of PCR products, containing PT5, lac O, RBS, ATG, 6xHis, MCSI/MCSII, stop codons, Col E1 and amp <sup>r</sup>	Qiagen
<b>Primers</b>		
Flp-F	ATG TTA TCT AAC TTA ACA AC; primer beginning with the start codon of the <i>flp-1</i> gene of <i>A. pleuropneumoniae</i> serotype 1	This work
Flp1-R	CTA TTG CTT AGT TAA GCC AT; primer ending with the stop codon of the <i>flp-1</i> gene of <i>A. pleuropneumoniae</i> serotype 1	This work
Flp2-F	ATG AAA ATA AAA AAA CTT TTA CAG; primer beginning with the start codon of the <i>flp-2</i> gene of <i>A. pleuropneumoniae</i> serotype 1	This work
Flp-R	CTA AGA CGT GCT TAA CAG TGC; primer ending with the stop codon of the <i>flp-2</i> gene of <i>A. pleuropneumoniae</i> serotype 1	This work
pQE-rev		Qiagen

## CHAPITRE V

### DISCUSSION

#### 5.1 LE LOCUS DE FIMBRIAE *flp-rcp-tad* CHEZ *A. PLEUROPNEUMONIAE*

Comme il a été mentionné au chapitre II, les fimbriae de type IV englobent un large éventail de fimbriae de bactéries Gram-négatives. Tout d'abord découvert chez *A. actinomycetemcomitans*, le locus des gènes *flp-rcp-tad* encode lui aussi un système de sécrétion pour la synthèse et l'assemblage de fimbriae de type IV. Des locus comparables sont retrouvés chez de nombreuses autres bactéries (figure 2.2). (Kachlany et al., 2001). Des travaux de recherche effectués dans notre laboratoire démontrent que le locus chez *A. pleuropneumoniae* possède la même organisation que ceux d'*A. actinomycetemcomitans* et *P. multocida*, c'est-à-dire les mêmes ORFs dans le même ordre. Les 14 ORFs sont tous transcrits dans la même orientation. Ce sont dans l'ordre : *flp-1*, *flp-2*, *orfB*, *rcpC*, *rcpA*, *rcpB*, *tadZ*, *tadA*, *tadB*, *tadC*, *tadD*, *tadE*, *tadF* et *tadG* (figure 5.1).

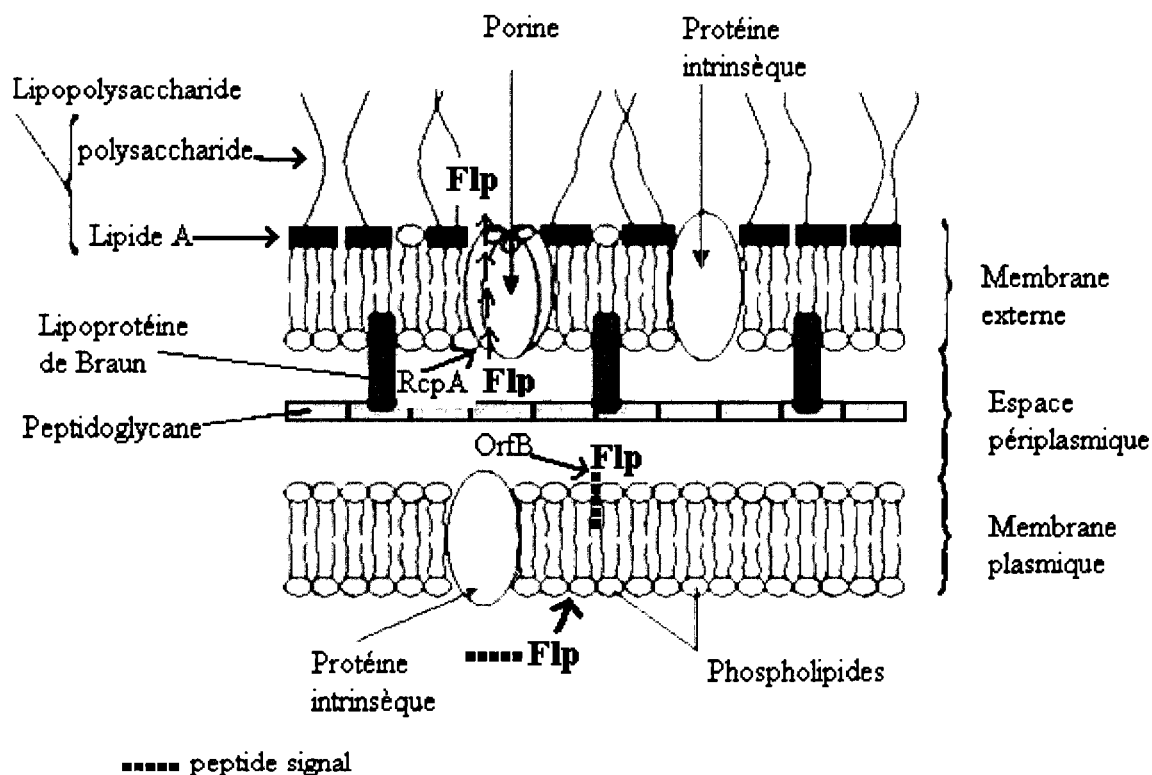


**FIGURE 5.1 :** Organisation des gènes du locus *flp-rcp-tad* chez *A. pleuropneumoniae*

Les promoteurs des 14 gènes précédents ont été identifiés en se basant sur l'alignement des régions promotrices de 12 gènes d'*A. pleuropneumoniae* (Doree et Mulks, 2001). Les RBS des gènes du locus *flp-rcp-tad* ont de plus été trouvés.

Le rôle potentiel de certains gènes du locus peut être déduit à partir du rôle du gène homologue identifié chez *A. actinomycetemcomitans* et de motifs conservés caractéristiques contenus dans leur séquence en acides aminés. Le gène *flp-1* encoderait la prépiline, c'est-à-dire la piline avec son peptide signal, permettant à la protéine d'aller

se fixer à la membrane plasmique. Le gène *orfB* encoderait la prépine peptidase, l'enzyme qui coupe la prépine en piline pour former la protéine mature Flp, lui permettant ainsi de flotter dans l'espace périplasmique. Le produit du gène *rcpA* d'*A. pleuropneumoniae* présente de fortes homologues avec les protéines GspD, PulD et pIV. Ces protéines font partie de la famille des sécrétines (Nouwen et *al.*, 1999). Les sécrétines sont requises pour la sécrétion extra-cellulaire, l'assemblage des phages filamenteux et la biogenèse des pili. Elles forment des canaux dans la membrane externe des bactéries. Le canal formé par RcpA pourrait permettre la sécrétion des fimbriae comme Flp, tandis que la protéine TadA serait une ATPase qui servirait à fournir de l'énergie au système (figure 5.2). En effet, le gène *tadA* démontre une similarité avec le système de sécrétion NTPase de type II et IV et de récents travaux démontrent que TadA hydrolyse l'ATP (Planet et *al.*, 2001).



**FIGURE 5.2** : Schématisation du passage de la protéine Flp à travers la paroi d'une bactérie Gram négative.

La fonction exacte des autres gènes du locus est encore inconnue. La fonction de *flp-2* est toutefois intrigante. La phylogénie des membres de la famille *flp* montre une tendance à la multiplication et le maintien d'allèles multiples *flp*. Ainsi, plusieurs organismes arborent plus d'une copie du gène *flp*, et ces copies ne sont pas toujours homologues entre elles. Comme ces gènes sont retrouvés et conservés chez plusieurs microorganismes tels les bactéries et les Archae, ce système pourrait fournir d'importantes fonctions pour la survie de divers microorganismes, incluant une grande quantité de bactéries pathogènes que l'on retrouve dans l'environnement.

## 5.2 LES PROTÉINES FLP-1 ET FLP-2 CHEZ *A. PLEUROPNEUMONIAE*

### 5.2.1 Analyse de Flp1

Des études bio-informatiques effectuées dans notre laboratoire ont révélées que *flp-1* d'*A. pleuropneumoniae* possède un ORF de 234 pb qui encode une protéine de 77 acides aminés avec un poids moléculaire calculé de 8,52 kDa (figure 5.3). La protéine Flp1 mature possède 51 acides aminés après clivage de la séquence signal de 26 acides aminés. Le poids moléculaire de Flp1 mature est estimé à 5,55 kDa.

```

2   ATGTTATCTA ACTTAACAAC CAAAGCATAT ATTTTCAGTAA CCGAAGGTAT
    M L S   N L T   T K A Y   I S V   T E G
52  CCGTCGTTTT AAAGAAAACC AACAAGGTGT AACTGCAATC GAATACGGTT
    I R R F   K E N   Q Q G   V T A I   E Y G
102 TGATCGCTGT AGCGGTAGCC ATTCTAATTG TTGCGGTGTT CTATAACGAC
    L I A   I A V A   I L I   V A V   F Y N D
152 AAAGGTTTCA TTCAACAATT AAAATTAAAA TTCGATCAAC TTACAAAAC
    K G F   I Q Q   L K L K   F D Q   L T K
202 AGTACAAGGT GCAAATGGCT TAACTAAGCA ATAG
    T V Q G   A N G   L T K   Q -

```

**FIGURE 5.3 :** Séquence du gène *flp1* et de la protéine Flp1 chez *A. pleuropneumoniae* sérotype 1 de la souche 4074 (peptide signal et protéine)

D'après des observations en microscopie électronique à haute résolution chez *A. actinomycetemcomitans*, les fimbriae sont en amas, intimement associés avec les bactéries. Cependant, ils ne semblent pas ancrés dans la membrane ou localisés à une

position particulière de la bactérie, comme aux pôles. Aucun site potentiel d'insertion n'a été détecté, tels que des indentations ou des contractions de la membrane aux points de contact bactéries-fimbriae. Il est possible que les bactéries libèrent les fimbriae dans le milieu extra-cellulaire et qu'ensuite elles se lient à eux (Kachlany et *al*, 2001b).

### 5.2.2 Analyse de Flp2

Pour ce qui est du gène *flp-2* d'*A. pleuropneumoniae*, des études bio-informatiques effectués dans notre laboratoire ont révélées qu'il possède un ORF de 198 pb qui encode une protéine de 65 acides aminés avec un poids moléculaire calculé de 7,26 kDa (figure 5.4). La protéine Flp2 mature possède 50 acides aminés après clivage de la séquence signal de 15 acides aminés. Le poids moléculaire de Flp2 mature est estimé à 5.37 kDa.

```

2  ATGAAAATAA AAAAAGCTTTT ACAGTTTTAT CGGCAACAAC AAGGTATTAC
   M  K  I  K  K  L  L  Q  F  Y  R  Q  Q  Q  G  I
52 TTCTCTTGAA TACGGCTTAG TTGCCGTTGC GATGGCGGTA TTTGTTGTTG
   T  S  L  E  Y  G  L  V  A  V  A  M  A  V  F  V  V
102 CCGTTTTATA CGGTGACTCA AGTTTCACGG ATGAAACGTT AAGAAAATTT
   A  V  L  Y  G  D  S  S  F  T  D  E  T  L  R  K  F
152 AAACAGCTCT CCGAGCTAGT CACTTCGGCA CTGTTAAGCA CGTCTTAG
   K  Q  L  S  E  L  V  T  S  A  L  L  S  T  S  -

```

**FIGURE 5.4 :** Séquence du gène *flp2* et de la protéine Flp2 chez *A. pleuropneumoniae* sérotype 1 de la souche 4074 (peptide signal et protéine)

### 5.2.3 Classification des protéines Flp1 et Flp2 chez *A. pleuropneumoniae*

L'alignement des prépilines des locus analogues à *flp-rcp-tad* chez différentes bactéries permet de mettre en relief des caractéristiques communes qui les distinguent des autres prépilines de type IVB (Kachlany et *al.*, 2001a). Premièrement, les prépilines Flp ont toutes entre 50 et 90 acides aminés, alors que les autres prépilines de type IV excèdent généralement 120 acides aminés. Deuxièmement, elles possèdent un motif partagé, le *motif Flp*. Il s'agit du glutamate (E) en position +5 immédiatement suivi par une tyrosine

(Y), inclus à l'intérieur d'une série d'environ 20 acides aminés hydrophobes. Troisièmement, on note fréquemment une phénylalanine (F) près du milieu du domaine hydrophile C-terminal et quatrièmement, le domaine C-terminal est plus court que celui des autres prépilines de type IV. Les prépilines Flp1 et Flp2 d'*A. pleuropneumoniae* peuvent être assignées à la classe des prépilines de fimbriae de type IVB car elles répondent aux quatre caractéristiques communes qui distinguent ces prépilines. La prépiline Flp1 a 77 acides aminés et Flp2 en a 65. Le motif *Flp* est présent et retrouvé dans une séquence de 20 acides aminés hydrophobes. On retrouve une phénylalanine (F) en position +35 et +27 de Flp1 et Flp2 respectivement. Les séquences de Flp1 et Flp2 ont 35,1% d'identité.

Le fait qu'*A. pleuropneumoniae* possède l'information génétique pour produire deux protéines Flp très similaires n'est pas encore élucidé. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées sur la fonction biologique et la signification des allèles dupliquées. La duplication et la divergence des gènes *flp* chez les bactéries doivent être importante pour la diversification des propriétés de colonisation de ces organismes (Kachlany et al., 2001b). Les génomes d'*Haemophilus ducreyi*, *Pasteurella multocida* et *Chlorobium tepidum* contiennent par exemple, plus de trois copies du gène *flp* (Kachlany et al., 2001a). De plus, certaines bactéries comme *Kingella denitrificans* (Weir et al., 1996) possèdent de multiples copies de gènes de pilines auxquelles il manque des portions N-terminales les empêchant d'être transcrites. Ces copies silencieuses contribueraient à la différence de séquences en faisant des recombinaisons avec la copie exprimée pour produire des pilines antigéniquement distinctes. *A. pleuropneumoniae* pourrait aussi exprimer différenciellement les deux allèles *flp* pour varier les déterminants antigéniques. Flp2 pourrait aussi permettre l'interaction d'*A. pleuropneumoniae* avec des surfaces différentes de celles de Flp1, ce qui permettrait à *A. pleuropneumoniae* de s'adapter aux différentes conditions de l'hôte.

Il serait intéressant de déterminer si le gène *flp-2* est effectivement exprimé dans certaines conditions, en fonction des différents éléments de régulation qui entrent en action. Les travaux préliminaires effectués sur *flp-2* d'*A. actinomycetemcomitans*

suggèrent que le gène pourrait ne pas être exprimé (Kachlany et *al.*, 2001a). Cependant, la protéine est produite chez *E. coli* lorsque la région en amont de *flp-1*, qui contient le RBS, est fusionnée à *flp-2*. Nous étudions présentement l'expression *in vitro* et *ex vivo* des gènes *flp1* et *flp2* chez *A. pleuropneumoniae* par la réaction RT-PCR.

### 5.3 IN VITRO VS EX VIVO

Certains gènes de virulence sont exprimés différemment en fonction du milieu dans lequel se retrouve la bactérie. La culture *in vitro* permet de fournir plusieurs informations sur le mécanisme pathogène de la bactérie mais ne peut pas reproduire tous les aspects de l'interaction entre le pathogène et son hôte (Chiang et *al.*, 1999). En effet, lorsque le porc est infecté par *A. pleuropneumoniae*, sa température corporelle augmente et une réponse immunitaire se développe, provoquant ainsi un stress pour le pathogène. De plus, la bactérie s'adhère préférentiellement aux cellules alvéolaires de l'épithélium du tractus respiratoire inférieur et aux cellules ciliées des bronchioles terminales, où les nutriments essentiels pour la croissance de la bactérie sont restreints (Nicolet, 1979). Face à cet environnement de stress, la bactérie doit modifier l'expression de ces gènes. Elle régule à la baisse l'expression de gènes moins importants face à ce stress, et elle régule à la hausse ceux qui sont spécifiquement requis pour la survie du pathogène dans l'hôte. Il semble alors probable que les gènes induits *in vivo*, c'est-à-dire induits lorsque la bactérie se retrouve chez l'hôte (le porc), jouent un rôle important dans la pathogenèse (Chiang et *al.*, 1999).

Par exemple, dans le but de se débarrasser du pathogène, les cellules de l'hôte vont utiliser des radicaux libres pour former des dérivés toxiques qui vont s'attaquer à la membrane cellulaire de la bactérie. Durant l'infection des poumons du porc, *A. pleuropneumoniae* est exposée à des radicaux libres sous forme de superoxydes et de peroxydes, générés par l'éclatement oxydatif des neutrophiles (Buettner et *al.*, 1993). Pour survivre et pour protéger son métabolisme cellulaire contre cet environnement dangereux, *A. pleuropneumoniae* doit produire une enzyme capable d'inactiver ces dérivés toxiques. La bactérie doit alors réguler à la hausse les gènes impliqués dans la

production de ces enzymes. Elle produit alors la catalase et deux superoxydes dismutases, SodA et SodC permettant de contrer en partie le stress oxydatif (Manchado et *al.*, 2000). En laboratoire, il est possible de tenter de reproduire le milieu *in vivo* en ajoutant des éléments, comme le sérum de porc, aux milieux de culture de la bactérie. Il s'agit dans ces cas de modèles *ex vivo*.

L'étude de l'expression *in vitro* versus *ex vivo* des gènes *flp1* et *flp2* chez *A. pleuropneumoniae* nous permettrait peut-être de démontrer que l'expression de ces gènes est augmentée lors de l'ajout de sérum de porc dans le milieu de culture. Il pourrait ainsi s'agir de gènes menant à la production de protéines antigéniques essentielles à la survie de la bactérie. Ces protéines pourraient ainsi servir à l'élaboration ultérieure d'un vaccin efficace. Il serait intéressant de soumettre les cultures *in vitro* d'*A. pleuropneumoniae* à différents facteurs de stress comme il a déjà été effectué chez *A. actinomycetemcomitans*, dans le but de mieux comprendre le mode de régulation de ces gènes, mieux connaître les conditions optimales pour l'expression des gènes à l'étude (Goulhen et *al.*, 2003).

En effet, plusieurs facteurs de stress pourraient provoquer l'induction de gènes de virulence chez une bactérie comme *A. pleuropneumoniae*. Par exemple, dans les tissus nécrotiques des poumons du porc, la concentration en oxygène est faible, provoquant ainsi un stress pour la bactérie. Il pourrait alors être intéressant d'étudier l'expression des gènes *flp1* et *flp2* en soumettant la culture *in vitro* en condition d'anaérobiose comme il a déjà été effectué lors de travaux sur une diméthyle sulfoxide réductase (*dmsA*) chez *A. pleuropneumoniae* (Baltes et *al.*, 2003). De plus, lorsque le porc est infecté, sa température corporelle augmente, contribuant une fois de plus à un environnement de stress. En effet, suite à cette augmentation de température, certaines protéines seront produites. Il s'agit de protéines de la famille des protéines de choc thermique (Wirth et *al.*, 2002). Suite à l'infection, le milieu environnant la bactérie va aussi s'acidifier par les phagosomes. Certaines protéines devront alors être produites suite à cette diminution de pH pour permettre au pathogène de survivre face à ce stress (Fisher et *al.*, 2002). Il s'agit ici de plusieurs facteurs de stress dont nous pourrions nous



servir dans le but de reproduire le milieu *in vivo* d'*A. pleuropneumoniae* en laboratoire (modèles *ex vivo*) pour pouvoir étudier l'expression des gènes *flp1* et *flp2*.

Un autre modèle qui tente à mimer une situation *in vivo* (*ex vivo*), couramment utilisé dans des études ultérieures, est l'utilisation du bronchoalveolar lavage fluid (BALF) (Jacobsen et al., 2005). Il serait intéressant d'étudier l'expression des gènes *flp1* et *flp2* chez *A. pleuropneumoniae* lors de l'ajout de BALF dans le milieu de culture. Une étude démontre une augmentation de la production de douze protéines différentes chez *A. pleuropneumoniae* lors de l'ajout de BALF dans le milieu de culture (Jacobsen et al., 2005). De plus, il a été démontré que la concentration de certaines protéines d'*A. pleuropneumoniae* est significativement augmentée dans le liquide des bronches et des alvéoles de porcs infectés mais non dans le sérum de ces derniers (Hennig-Pauka et al., 2006). Le lavage des poumons s'effectue en utilisant un tube endotrachéal et un cathéter. Le liquide récupéré des poumons (le BALF) est ensuite examiné microbiologiquement (Delbeck et al., 1997).

#### **5.4 FLP1 ET FLP2 : ANTIGÈNES ET/OU FACTEURS DE VIRULENCE POTENTIELS**

À ce jour, deux types de vaccins sont produits pour contrer *A. pleuropneumoniae*. Le premier type de vaccin est fabriqué à partir d'un ensemble de protéines antigéniques de la bactérie (vaccin sous-unités), et le deuxième est composé de la bactérie vivante mais dont la virulence est atténuée (vaccin adjuvé). Cependant, quinze sérotypes sont identifiés chez *A. pleuropneumoniae*, rendant ainsi difficile la production d'un vaccin efficace contre tous ces sérotypes (Haesebrouck et al., 2004). Le vaccin fabriqué à partir d'un ensemble de protéines antigéniques a des avantages théoriques importants car ils confèrent une protection contre tous les sérotypes, tandis que celui utilisant la bactérie atténuée entraîne une protection limitée aux sérotypes inclus dans la préparation vaccinale (Haesebrouck et al., 2004). Malheureusement, aucun vaccin n'est à ce jour efficace contre l'ensemble des sérotypes d'*A. pleuropneumoniae*, démontrant bien le manque de connaissances des protéines antigéniques essentielles à la survie de la

bactérie. C'est pourquoi la prévention par la vaccination demande une plus grande connaissance des facteurs de virulence et des protéines susceptibles de stimuler le système immunitaire porcin comme les fimbriae Flp1 et Flp2.

Il a été démontré chez *A. actinomycetemcomitans* que la protéine Flp1 est associée à la surface de la cellule bactérienne, stimulant ainsi la production d'anticorps contre cette bactérie (Kachlany et al., 2001a). De plus, la mutation du gène *flp-1* à l'aide d'un transposon, a démontré un arrêt de la production de fimbriae ainsi que la production d'un mutant qui n'adhère plus aux surfaces (Kachlany et al., 2001a). Flp1 chez *A. actinomycetemcomitans* est un antigène et un facteur de virulence. Dans notre laboratoire, nous avons démontré la présence d'anticorps anti-Flp1 dans le sérum de porcs infectés par *A. pleuropneumoniae*. La protéine Flp1 chez cette bactérie est donc un antigène. Il resterait maintenant à démontrer que cette protéine est impliquée dans l'adhérence de la bactérie en mutant le gène *flp-1* à l'aide d'un transposon, comme il a déjà été fait chez *A. actinomycetemcomitans* (Kachlany et al., 2001a). La protéine Flp2 ne serait pas produite chez *A. actinomycetemcomitans*. En concordance avec cette étude, nos travaux sur *A. pleuropneumoniae* montrent qu'il n'y aurait pas de production d'anticorps anti-Flp2 dans le sérum de porcs infectés. Peut-être que le sérum que nous avons utilisé lors du Western-blot n'a pas produit d'anticorps anti-Flp2 dans ce contexte d'infection. *A. pleuropneumoniae* produirait Flp2 seulement lorsque la bactérie a besoin d'interagir avec des surfaces différentes de celles de Flp1, lui permettant de s'adapter aux différentes conditions de l'hôte. En effet, peut-être existe-t-il plusieurs copies du gène *flp* dans le but de produire des pilines antigéniquement distinctes.

Comme il a été mentionné au chapitre III, les vaccins composés de protéines antigéniques actuels, comportent trois toxines Apx et une protéine de membrane externe ou plusieurs antigènes capsulaires. Ces vaccins n'empêchent cependant pas toujours la colonisation des voies respiratoires. En effet, l'adhésion aux cellules épithéliales des bronchioles terminales et aux alvéoles, permet à la bactérie de sécréter ces toxines directement à la surface membranaire des cellules de l'hôte, provoquant la destruction des cellules de l'hôte même en présence des anticorps induit lors de la vaccination

(Haesebrouck et *al.*, 2004). S'il était possible d'induire la production d'anticorps contre ces protéines d'adhésion de la bactérie, l'adhérence de la bactérie avec les cellules de l'hôte pourrait être inhibée.

## CHAPITRE VI

### CONCLUSION

L'industrie porcine occupe de nos jours une place importante dans l'économie mondiale. Cependant, elle est fortement déstabilisée par de nombreuses bactéries pathogènes affectant le porc, dont une des plus inquiétantes est *Actinobacillus pleuropneumoniae*. En effet, la pleuropneumonie porcine est devenue, voilà 25 ans, une des principales maladies d'origine bactérienne en production porcine. Cette affection mortelle entraîne des pertes économiques considérables dans l'industrie porcine dues à la mortalité des porcs, aux coûts des traitements et du retard de croissance. Plusieurs gènes de virulence sont présentement identifiés chez *A. pleuropneumoniae*, mais aucun ne permettent encore l'élaboration de vaccins efficaces. Il faut donc poursuivre la mise en évidence et la caractérisation de nouveaux facteurs de virulence. Dans ce sens, nous nous sommes intéressé aux protéines qui permettent l'adhérence d'*A. pleuropneumoniae* aux poumons de l'hôte.

L'expression de fimbriae est importante pour les stades initiaux des infections bactériennes (Hoepelmann et al., 1992) et il est bien établi qu'*A. pleuropneumoniae* s'attache aux cellules épithéliales du tractus respiratoire de l'hôte (Dom et al., 1994). Notre laboratoire a identifié de nouveaux fimbriae de type IV : les protéines Flp1 et Flp2 encodées par les gènes *flp-1* et *flp2*. Il serait intéressant d'étudier le rôle de ces structures dans l'adhérence et la colonisation des tissus de l'hôte par *A. pleuropneumoniae* menant à la pleuropneumonie. Comme il a été mentionné à la section 2.3, le locus *flp-rcp-tad* encode un système de sécrétion pour la synthèse et l'assemblage de fimbriae de type IV, qui est retrouvé chez diverses autres bactéries (Kachlany et al., 2001). Chez *A. actinomycetemcomitans*, la protéine Flp-1 est impliquée dans l'adhésion de la bactérie, tandis que la signification du gène *flp-2* n'est pas encore connue (Kachlany et al., 2001). Les protéines Flp-1 et Flp-2 chez *A. pleuropneumoniae* pourraient être impliquées dans l'adhérence de la bactérie aux cellules pulmonaires du porc, donc importantes dans la virulence de la bactérie et potentiellement immunogènes.

Mes travaux ont portés sur l'identification et la caractérisation des gènes *flp1* et *flp2* chez *A. pleuropneumoniae* de sérotype 1, deux gènes produisant les fimbriae Flp1 et Flp2 impliqués dans l'adhérence de la bactérie. Il s'agirait de facteurs de virulence et d'antigènes potentiels.

Nous avons vérifié l'immunogénicité des protéines Flp1 et Flp2. Nous avons tout d'abord amplifié par PCR les gènes qui encodent les protéines Flp1 et Flp2 d' *A. pleuropneumoniae* du sérotype 1. Nous avons ensuite cloné ces fragments dans le vecteur d'expression pQE30. Les cellules compétentes *Escherichia coli* M15 (pREP4) ont été transformées avec chacune des constructions et les clones ont ensuite été induits pour la production des protéines Flp1 et Flp2 par l'ajout d'IPTG. Nous avons utilisé comme anticorps primaires lors de l'Immuno-blot, un sérum de porc convalescent infecté par *A. pleuropneumoniae* de sérotype 1. Ce sérum a réagit avec la protéine Flp1. Ces résultats nous indiquent que cette protéine induit une réponse immunitaire chez le porc et pourrait alors être un bon candidat pour la fabrication d'un vaccin contre *A. pleuropneumoniae*, confirmant ainsi notre hypothèse. Le sérum n'a cependant pas réagit avec la protéine Flp2. En effet, peut-être qu'*A. pleuropneumoniae* va produire Flp2 seulement lorsque la bactérie a besoin d'interagir avec des surfaces différentes de celles de Flp1. Il serait intéressant de vérifier l'immunogénicité de la protéine Flp2 en utilisant d'autres sérums de porc.

Il est possible que les fimbriae Flp chez *A. pleuropneumoniae* jouent un tout autre rôle que l'adhérence aux cellules épithéliales des poumons de l'hôte. En effet, *A. pleuropneumoniae* possède d'autres types de fimbriae (Zhang et al., 2000) et des LPS (Bélanger et al., 1990; Bélanger et al., 1992) qui peuvent être associés à l'attachement aux cellules de l'hôte. Chez *A. actinomycetemcomitans*, ces fimbriae pourraient jouer un rôle dans la formation de biofilms et permettre l'auto-agrégation des bactéries (Kachlany et al., 2001b). Il serait intéressant d'éclaircir le rôle qu'ils peuvent avoir chez *A. pleuropneumoniae*, et surtout de déterminer s'ils sont importants pour la virulence de la bactérie, en créant un mutant Flp1 par transposition.

Bref, nous avons démontré que Flp1 est une protéine fortement immunogène, qui pourrait être intéressante pour la fabrication d'un vaccin composé de protéines antigéniques. En effet, le développement futur d'un «anti-piline anti-Flp1» pourrait peut-être permettre une protection totale des porcs contre la bactérie, un des buts importants de nos recherches chez *A. pleuropneumoniae*.

## BIBLIOGRAPHIE

- Archambault, M., et al., (2003) Identification and preliminary characterization of a 75-kDa hemin- and hemoglobin-binding outer membrane protein of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Can J Vet Res.* 67(4): p. 271-7.
- Baltes N., Tonpitak W., Gerlach G.F., Hennig-Pauka I., Hoffmann-Moujahid A., Ganter M. & Rothkotter H.J. (2001) *Actinobacillus pleuropneumoniae* iron transport and urease activity: effects on bacterial virulence and host immune response. *Infect. Immun.*, 69, 472-8.
- Baltes N, Hennig-Pauka I, Jacobsen I, Gruber AD, Gerlach GF., (2003) Identification of dimethyl sulfoxide reductase in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and its role in infection, *Infect Immun.*, 71(12):6784-92.
- Beaudet R., McSween G., Boulay G., Rousseau P., Bisaillon J.G., Descoteaux J.P. & Ruppanner R. (1994). Protection of mice and swine against infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae* by vaccination. *Vet. Microbiol.*, 39, 71-81.
- Bélanger, M., Dubreuil, D., Harel, J., Girard, C., Jacques, M. (1990) Role of lipopolysaccharides in adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to porcine tracheal rings, *Infect. Immun.* 58: 3523-3530.
- Bélanger, M., Rioux, S., Foiry, B., Jacques, M. (1992) Affinity for porcine respiratory tract mucus is found in some isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *FEMS Microbiol. Lett.* 97: 119-126.
- Bélanger, M., Dubreuil, D., Jacques, M. (1994) Proteins found within porcine respiratory tract secretions bind lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Infect. Immun.* 62: 868-873.
- Bélanger, M., Begin, C., Jacques, M. (1995) Lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* bind pig hemoglobin, *Infect. Immun.* 63: 656-662.
- Blackall, P.J., et al., *Proposal of a new serovar of Actinobacillus pleuropneumoniae: serovar 15.* *Vet Microbiol*, 2002. 84(1-2): p. 47-52
- Bossé J.T., Johnson R.P., Nemec M. & Rosendal S. (1992) Protective local and systemic antibody responses of swine exposed to an aerosol of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Infect Immun.*, 60, 479-84.
- Bossé J.T. & MacInnes J.I. (1997) Genetic and biochemical analyses of *Actinobacillus pleuropneumoniae* urease. *Infect. Immun.*, 65, 4389-4394.
- Bossé J.T. & MacInnes, J.I. (2000) Urease activity may contribute to the ability of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to establish infection. *Can. J. Vet. Res.*, 64, 45-150.

Buettner, G. R. (1993). The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch. Biochem. Biophys.* 300:535- 543

Chiang, S.L., Mekalanos, J.J., Holden, D.W. (1999) In vivo genetic analysis of bacterial virulence, *Annu. Rev. Microbiol.* 53:129–154.

Chiers K., Van Overbeke, I., De Laender, P., Ducatelle, R., Carel, S. and Haesebrouck, F., 1998. Effects of endobronchial challenge with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9 of pigs vaccinated with inactivated vaccines containing the Apx toxins. *Vet. Quart.* 20, pp. 65–69.

Cho, W-S. & Chae C. (2001) Expression of the *ApxIV* gene in pigs naturally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J. Comp. Pathol.*, 125, 34-40.

Clewell, D.B. (1993) Bacterial conjugation. Plenum Press, New York, NY.

Cruz W.T., Nedialkov Y.A., Thacker B.J. & Mulks M.H., (1996) Molecular characterization of a 48-kilodalton outer membrane protein of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.*, 64: 83-90.

Delbeck F, Tegeler R, Ganter M., (1997) Bronchoalveolar lavage on pig breeding farms, *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 104(9):374-8.

Deneer H.G. & Potter A.A. (1989a) Effect of iron restriction on the outer membrane proteins of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.*, 57: 798 804.

Deneer H.G. & Potter A.A. (1989b) Identification of a maltose-inducible major outer membrane protein in *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. *Microb. Pathog.*, 6, 425-32.

Devenish J, Rosendal S, Bosse JT (1990) Humoral antibody response and protective immunity in swine following immunization with the 104-kilodalton hemolysin of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Infect. Immun.* 58: 3829-3832.

Dom, P., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., Charlier, G. (1994) In vivo association of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 with the respiratory epithelium of pigs, *Infect. Immun.* 62: 1262-1267.

Doree SM, Mulks MH. (2001) Identification of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* consensus promoter structure. *J Bacteriol.* 183(6):1983-9.

Drake, S.L., Sandstedt, S.A., Koomey, M. (1997) PilP, a pilus biogenesis lipoprotein in *Neisseria gonorrhoeae*, affects expression of PilQ as a high-molecular-mass multimer, *Mol. Microbiol.* 23:657-668.



- Fenwick B. & Henry S. (1994) Porcine pleuropneumonia, clinical update, J. Am. Vet. Med. Assoc., 204, 1334-1340.
- Fernandez, L.A., Berenguer, J. (2000) Secretion and assembly of regular surface structures in Gram-negative bacteria, FEMS Microbiol. Rev. 24:21-44.
- Fisher MA, Plikaytis BB, Shinnick TM., (2002), Microarray analysis of the Mycobacterium tuberculosis transcriptional response to the acidic conditions found in phagosomes., J Bacteriol. 184(14):4025-32.
- Forest, K.T., Tainer, J.A. (1997) Type-4 pilus structure :outside to inside and top to bottom- a minireview, Gene 192: 165-169.
- Forest K.T., Langford P.R., Kroll J.S. & Getzoff E.D. (2000) Cu,Zn superoxide dismutase structure from a microbial pathogen establishes a class with conserved dimmer interface. J. Mol. Biol., 296, 145-153.
- Frey, J., Nicolet, J. (1991) Immunological properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae* hemolysin I, Vet. Microbiol. 28: 61-73.
- Frey, J., Haldimann, A., Nicolet, J., Boffini, A., Prentki, P. (1994) Sequence analysis and transcription of the *apxI* operon (hemolysin I) from *Actinobacillus pleuropneumoniae*, Gene 142: 97-102.
- Frey, J. (1995) Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins. Trends. Microbil., 3, 257-261.
- Frey J, Kuhnert P., Villiger L. & Nicolet J. (1996) Cloning and characterization of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* outer membrane protein belonging to the family of PAL lipoproteins. Res. Microbiol., 147, 351-361.
- Frosch, M., Edwards, U., Bousset, K., Krausse, B., Weisgerber, C. (1991) Evidence for a common molecular origin of the capsule gene loci in Gram-negative bacteria expressing group II capsular polysaccharides, Mol. Microbiol. 5: 1251-1263.
- Fuller T.E. & Mulks M.H. (1995) Characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* riboflavin biosynthesis genes. J. Bacteriol., 177, 7265-7270.
- Fuller T.E., Thacker B.J. & Mulks M.H. (1996) A riboflavin auxotroph of *Actinobacillus pleuropneumoniae* is attenuated in swine. Infect. Immun., 64, 4659-4664.
- Garcia-Cuellar C., Montanez C., Tenorio V., Reyes-Esparza J., Duran M.J., Negrete E., Guerrero A. & de I.G. (2000) A 24-kDa cloned zinc metalloprotease from *Actinobacillus pleuropneumoniae* is common to all serotypes and cleave actin *in vitro*. Can. J. Vet. Res., 64, 88-95.

Gerlach, G.-F., Klashinsky, S., Anderson, C., Potter, A.A., Willson, P.J. (1992) Characterization of two genes encoding distinct transferrin-binding proteins in different *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates, *Infect. Immun.* 60: 3253-3261.

Gonzalez G.C., Yu R.H., Rosteck P.R.J. & Schryvers A.B. (1995) Sequence, genetic analysis, and expression of *Actinobacillus pleuropneumoniae* transferring receptor genes. *Microbiol.*, 141, 2405-2416.

Goulhen F, Grenier D, Mayrand D. (2003), Stress response in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: induction of general and specific stress proteins, *Res Microbiol.*, 154(1):43-8.

Gram T., Ahrens P. & Nielsen J.P. (1996) Evaluation of a PCR for detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in mixed bacterial cultures from tonsils. *Vet. Microbiol.*, 51, 95-104.

Gygi, D., Nicolet, J., Hughes, C., Frey, J. (1992) Functional analysis of the  $\text{Ca}^{2+}$ -regulated hemolysin I operon of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1, *Infect. Immun.*, 60: 3059-3064.

Haase, E., Zmuda, J., Scannapieco, F. (1999) Identification and molecular analysis of rough-colony-specific outer membrane proteins of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Infect. Immun.* 67: 2901-2908.

Haesebrouck F., Chiers K., Van Overbeke I. & Ducatelle, R. (1997) *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in pigs: the role of virulence factors in pathogenesis and protection. *Vet. Microbiol.*, 58, 239-249.

Haesebrouck, F. Pasmans, K. Chiers, Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect?, *Veterinary Microbiology* 100 (2004) 255-268

Hahn, H.P. (1997) The type-4 pilus is the major virulence-associated adhesin of *Pseudomonas aeruginosa* - a review, *Gene* 192: 99-108.

Harrison, L.R., Klinger, R.B., Shoey, A.R., McGowan, M.G. (1978) *Haemophilus parahaemolyticus* associated pleuropneumonia in Pennsylvania swine, *Amer. Ass. Vet. Lab. Diagn.* 21<sup>st</sup> Ann. Proc. 209-216.

Hennig-Pauka I, Jacobsen I, Blecha F, Waldmann KH, Gerlach GF. (2006). Differential proteomic analysis reveals increased cathelicidin expression in porcine bronchoalveolar lavage fluid after an *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection. *Vet Res.* 37(1):75-87.

Higgins, R., Larivière, S., Mittal, K.R., Desrosiers, R., Désilets, A., Bédard-Royal, C., Clermont, R., Éthier, R., Simard, J. (1982) La pleuropneumonie porcine au Québec, *Méd. Vét. Numéro spécial.* 12:33-47.

- Hultgren, S.J., Jones, C.H., Normark, S. (1996) Bacterial adhesins and their assembly, *In Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, Neidhardt, F.C., éditeur, ASM Press, Washington DC, USA, pp. 2730-2756.
- Ingham, A., Y. Zhang, and C. Prideaux (2002) Attenuation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by inactivation of *aroQ*, *Vet Microbiol.* 84:263-73.
- Inzana, T.J., Ma, J., Workman, R.P., Gogolewski, P., Anderson, P. (1988) Virulence properties and protective efficacy of the capsular polymer of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* serotype 5, *Infect. Immun.* 56: 1880-1889.
- Inzana, T.J., Todd, J., Veit, H.P. (1993) Safety, stability, and efficacy of noncapsulated mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* for use in live vaccines *Infect. Immun.* 61: 1682-1686.
- Ishihara, K., Honma, K., Miura, T., Kato, T., Okuda, K. (1997) Cloning and sequence analysis of the fimbriae associated protein (*fap*) gene from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Microbial. Pathog.* 23: 63-69.
- Ito H., Osaki M., Uchida I., Ohya T. & Sekizaki T. (1998) Demonstration of the third antigenically distinct outer membrane lipoprotein (OmlA) in *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 7. *Fems Microbiol. Lett.*, 167, 303-308.
- Jacobsen ID, Meens J, Baltes N, Gerlach GF. 2005. Differential expression of non-cytoplasmic *Actinobacillus pleuropneumoniae* proteins induced by addition of bronchoalveolar lavage fluid. *Vet Microbiol.* 30;109(3-4):245-56.
- Jacques, M., *Surface polysaccharides and iron-uptake systems of Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Can J Vet Res*, 2004. 68(2): p. 81-5.
- Jansen, R., Briaire, J., Kamp, E.M., Gielkens, A.L., Smits, M.A. (1993) Cloning and characterization of the *Actinobacillus pleuropneumoniae*-RTX-toxin III (ApxIII) gene, *Infect. Immun.* 61: 947-954.
- Jansen, R., Briaire, J., van Geel, A.B., Kamp, E.M., Gielkens, A.L., Smits, M.A. (1994) Genetic map of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX-toxin (Apx) operons: characterization of the ApxIII operons, *Infect. Immun.* 62: 4411-4418.
- Jolie, R.A., Mulks, M.H., Thacker, B.J. (1994) Antigenic differences within *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Vet. Microbiol.* 38.
- Kachlany, S.C., Planet, P.J., Bhattacharjee, M.K., Kollia, E., DeSalle, R., Fine, D.H., Figurski, D.H. (2000) Nonspecific adherence by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* requires genes widespread in *Bacteria* and *Archaea*, *J. Bacteriol.* 182: 6169-6176.

Kachlany, S.C., Planet, P.J., DeSalle, R., Fine, D.H., Figurski, D.H., Kaplan, J.B. (2001a) *flp-1*, the first representative of a new pilin gene subfamily, is required for nonspecific adherence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, Mol. Microbiol. 40: 542-554.

Kachlany, S.C., Planet, P.J., DeSalle, R., Fine, D.H., Figurski, D.H. (2001b) Genes for tight adherence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: from plaque to plaque to pond scum, Trends in Microbiol. 9: 429-437.

Kallenius, G., Svenson, S.B., Hulberg, H., Molby, R., Helin, I., Cedergren, B., Windberg, J. (1981) Occurrence of P fimbriated *Escherichia coli* in urinary tract infection, Lancet ii, 1369-1372.

Kamp, E.M., Popma, J.K., Anakotta, J., Smits, M.A.. (1991) Identification of hemolytic and cytotoxic proteins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by use of monoclonal antibodies, Infect. Immun. 59: 3079-3085.

Kilian, M.; Nicolet, J.; Biberstein, E.L. (1978) Biochemical and serological characterization of *Haemophilus pleuropneumoniae* (Matthews and Pattison 1961) Shope 1964 and proposal of a neotype strain, Int. J. Syst. Bacteriol. 28: 20-26.

Klein CS, Piffer IA, Ceroni da Silva S, Schrank A, Favero MB, Schrank IS. (2003), Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by PCR on field strains from healthy and diseased pigs, Curr Microbiol. 2003 Jun;46(6):443-7.

Kobish, M., van den Bosch, J. F., (1992). Efficacy of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* subunit vaccine. Proc. 12<sup>th</sup> International Pig Veterinary Society Congress. The Hague, Netherlands. 216.

Krogfelt, K.A., Bergmans, H., Klemm, P. (1990) Direct evidence that the FimH protein is the mannose specific adhesin of *Escherichia coli* type 1 fimbriae, Infect. Immun. 58:1995-1999.

Labrie, J., et al., (2002). *Identification of genes involved in biosynthesis of Actinobacillus pleuropneumoniae serotype 1 O-antigen and biological properties of rough mutants*. J Endotoxin Res., 8(1): p. 27-38.

Lally E. T., Hill R. B., Kieba I. R. & Korostoff J. (1999). The interaction between RTX toxins and target cells. Trends Microbiol., 7, 356-361.

Lalonde G., O'Hanley P.D., Stocker B.A. & Denich K.T. (1994) Characterization of a 3-dehydroquinase gene from *Actinobacillus pleuropneumoniae* with homology to the eukaryote genes qa-2 and QUTE. Mol. Microbiol., 11, 273-280.

Langford P.R., Loynds B.M. & Kroll J.S. (1996) Cloning and molecular characterization of Cu,Zn superoxide dismutase from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Infect. Immun., 64, 5035-5041.

Leffler, H., Svanborg-Eden, C. (1980) Chemical identification of a glycosphingolipid receptor for *Escherichia coli* attaching to human urinary tract epithelial cells and agglutinating human erythrocytes, FEMS Microbiol. Lett. 8:127-134.

Maier, E., Reinhard, N., Benz, R., Frey, J. (1996) Channel-forming activity and channel size of the RTX toxins ApxI, ApxII, and ApxIII of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, Infect. Immun. 64: 4415-4423.

Manchado, M., C. Michan, and C. Pueyo. (2000). Hydrogen peroxide activates the SoxRS regulon in vivo. J. Bacteriol. 182:6842-6844.

Martin P.R. & Mulks M.H. (1999) Cloning and characterization of a gene encoding an antigenic membrane protein from *Actinobacillus pleuropneumoniae* with homology to ABC transporters. FEMS Immunol. Med. Microbiol., 25, 245-254.

McNamara, B.P., Donnenberg, M.S. (2000) Evidence for specificity in type 4 pilus biogenesis by enteropathogenic *Escherichia coli*, Microbiol. 146: 719-729.

Mikael, L.G., et al., (2002) Molecular cloning and characterization of the ferric hydroxamate uptake (*fhu*) operon in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Microbiology 148.(Pt.9.):2869.-82., 2002. 148: p. 2869-2882.

Mikael, L.G., et al., (2003) *fhuA* of *Actinobacillus pleuropneumoniae* encodes a ferrichrome receptor but is not regulated by iron. Infect.Immun.;71.(5.):2911.-5., 2003. 71: p. 2911-2915.

Mittal, K.R., Higgins, R., Larivière, S., Nadeau, M. (1992) Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains isolated from pigs in Quebec, Vet. Microbiol. 32.

Matthews, P.R.J., Pattison, I.H. (1961) The identification of a *Haemophilus*-like organism associated with pleuropneumonia and pleurisy in the pig, J. Comp. Pathol. 71: 44-52.

Mulks, M.H., Thacker, B.J. (1988) Efficacy of an *Haemophilus pleuropneumoniae* outer membrane subunit vaccine in swine, Proc. Int. Pig Vet. Soc. 10:81.

Mylrea, P.J., Fraser, G., Macqueen, P., Lambourne, D.A. (1974) Pleuropneumonia in pigs caused by *Haemophilus parahaemolyticus*, Aust. Vet. J. 50: 255-259.

Negrete-Abascal E., Garcia R.M., Reyes M.E., Godígez D. & de la Garza, M. (2000) Membrane vesicles released by *Actinobacillus pleuropneumoniae* contain protease and Apx toxins. FEMS Microbiol. Lett., 191, 109-113.

Negrete-Abascal, E., Reyes, M.E.; Garcia, R.M.; Vaca, S.; Giron, J.A.; Garcia, O.; Zenteno, E.; de la Garza, M. (2003) Flagella and Motility in *Actinobacillus pleuropneumoniae*, J. Bacteriol. 185: 664-668

Negrete-Abascal, E., Tenorio, V.R., Serrano, J.J., Garcia, C., de la Garza, M. (1994) Secreted proteases from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 degrade porcine gelatin, hemoglobin and immunoglobulin A, Can. J. Vet. Res. 58: 83-86.

Nicolet, J. (1979) *Haemophilus pleuropneumoniae*: threat to the modern pig, Pig American Sept-Oct: 18-19.

Nicolet, J. (1986) *Haemophilus* infections, In Diseases of swine, Leman, A.D., Straw, B., Glock, A.D., Mengeling, Penny, R.H.C., Scholl E., éditeurs, Iowa State University Press Ames.

Nielsen, R., Thomsen, A.D., Duedahl Vesterlund, S. (1976) Pleuropneumonia caused by *Haemophilus parahaemolyticus*, Nord. Vet. Med. 28: 349-352.

Nielsen, R. (1986) Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains and proposal of a new serotype: serotype 12, Acta Vet. Scand. 27: 453-455.

Nielsen, R., Andresen, L.O., Plambeck, T., Nielsen, J.P., Krarup, L.T., Jorsal, S.E. (1997) Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 2 strains isolated from pigs in two Danish herds, Vet. Microbiol. 54: 35-46.

Nouwen, N., Ranson, N., Saibil, H., Wolpensinger, B., Engel, A., Ghazi, A., Pugsley, A.P. (1999) Secretin PulD : association with pilot PulS, structure and ion-conducting channel formation, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 8173-8177.

Nunn, D., Lory, S. (1991) Product of the *Pseudomonas aeruginosa* gene *pilD* is a prepilin leader peptidase, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 3281-3285.

Orndorff, P.E., Falkow, S. (1984) Organisation and expression of genes responsible for type 1 piliation in *Escherichia coli*, J. Bacteriol. 159: 736-744.

Paradis, S.-É., Dubreuil, D., Rioux, S., Gottschalk, M., Jacques, M. (1994) High-molecular-mass lipopolysaccharides are involved in *Actinobacillus pleuropneumoniae* adherence to porcine respiratory tract cells, Infect. Immun. 62: 3311-3319.

Paradis, S.-É., Dubreuil, J.D., Gottschalk, M., Archambault, M., Jacques, M. (1999) Inhibition of adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to porcine respiratory tract cells by monoclonal antibodies directed against LPS and partial characterization of the LPS receptors, Curr. Microbiol. 39: 313-320.

Parge, H.E., Forest, K.T., Hickey, M.J., Christensen, D.A., Getzoff, E.D., Tainer, J.A. (1995) Structure of the fiber forming protein pilin at 2.6 Å resolution, Nature 378: 32-38.

Perreault, Nancy (2003) Recherche de protéines exportées chez la bactérie *Actinobacillus pleuropneumoniae* : identification d'un locus de fimbriae, Maîtrise en biophysique et biologie cellulaires, Université du Québec à Trois-Rivières.

PiJoan C. & Trigo F. (1990) Bacterial adhesion to mucosal surfaces with special reference to *Pasteurella multocida* isolates atrophic rhinitis. Can. J. Vet. Res., 54 Suppl., S16-S21.

Planet PJ, Kachlany SC, DeSalle R, Figurski DH. (2001) Phylogeny of genes for secretion NTPases: identification of the widespread tadA subfamily and development of a diagnostic key for gene classification. Proc Natl Acad Sci U S A. 98(5):2503-8

Pohl, S., Bertschinger, H.U., Frederiksen, W., Mannheim, W. (1983) Transfer of *Haemophilus pleuropneumoniae* and the *Pasteurella haemolytica*-like organism causing porcine necrotic pleuropneumonia to the genus *Actinobacillus* (*Actinobacillus pleuropneumoniae* comb. nov.) on the basis of phenotypic and deoxyribonucleic acid relatedness, International J. of Systematic Bacteriol. 33: 510-514.

Prideaux C.T., Lenghaus C., Krywult J. & Hodgson A.L.M. (1999) Vaccination and protection of pigs against pleuropneumonia with a vaccine strain of *Actinobacillus pleuropneumoniae* produced by site-specific mutagenesis of the ApxII operon. Infect. Immun., 67, 1962-1966.

Rosendal, S., Boyd, D.A., Gilbride, K.A. (1985) Comparative virulence of porcine *Haemophilus* bacteria, Can. J. Comp. Med. 49: 68-74.

Rossi-Campos, A., Anderson, C., Gerlach, G.-F., Klashinsky, S., Potter, A.A., Willson, P.J. (1992) Immunization of pigs against *Actinobacillus pleuropneumoniae* with two recombinant protein preparations, Vaccine 10: 512-518.

Rudel, T., Scheuerpflug, I., Meyer, T.F. (1995) *Neisseria* PilC protein identified as type-4 pilus tip-located adhesin, Nature 373: 357-359.

Ryll, R.R., Rudel, T., Scheuerpflug, I., Barten, R., Meyer, T.F. (1997) PilC of *Neisseria meningitidis* is involved in class II pilus formation and restores pilus assembly, natural transformation competence and adherence to epithelial cells in PilC-deficient gonococci, Mol. Microbiol. 23: 879-892.

Sanford, S.E., Josephson, G.K. (1981) Porcine neonatal coccidiosis, Can. Vet. J. 22: 282-285.

Schaller, A., Kuhn, R., Kuhnert, P., Nicolet, J., Anderson, T.J., MacInnes, J.I., Segers, R.P., Frey, J. (1999) Characterization of apxIVA, a new RTX determinant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, Microbiology 145: 2105-2116.

Schaller A., Djordjevic S.P., Eamens G.J., Forbes W.A., Kuhn R., Kuhnert P., Gottschalk M., Nicolet J. & Frey J. (2001) Identification and detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by PCR based on the gene *apxIVA*. Vet. Microbiol., 79, 47-62.

Schiefer, B., Moffatt, R.E., Greenfield, J., Agar, J.L., Majka, J.A. (1974) Porcine *Haemophilus parahaemolyticus* pneumonia in Saskatchewan. I. Natural occurrence and findings. Can. J. Comp. Med. 38: 99-104.

Shope, R. E. (1964) Porcine contagious pleuropneumonia. J. Exp. Med., 119, 357-368.

Sebunya, T.N., Saunders, J.R. (1982) Pulmonary clearance of *Haemophilus pleuropneumoniae* and *Serratia marcescens* in mice, Am. J. Vet. Res. 43: 1799-1801.

Shaw, C.E., Taylor, R.K. (1990) *Vibrio cholerae* 0395 *tcpA* pilin gene sequence and comparison of predicted protein structural features to those of type 4 pilins, Infect. Immun. 58: 3042-3049.

Shea RJ, Mulks MH. (2002) *ohr*, Encoding an organic hydroperoxide reductase, is an in vivo-induced gene in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Infect Immun., 70, 794- 802.

Soto, G.E., Hultgren, S.J. (1999) Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly, J. Bacteriol. 181:1059-1071.

Stevenson, A., J. MacDonald, and M. Roberts, (2003) Cloning and characterisation of type 4 fimbrial genes from *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Vet.Microbiol.20.;92.(1.-2.):121.-34., 92: p. 121-134.

Strom, M., Lory, S. (1993) Structure-function and biogenesis of the type IV pili, Annu. Rev. Microbiol. 47: 565-596.

Sun, D., Lafferty, M.J., Peek, J.A., Taylor, R.K. (1997) Domains within the *Vibrio cholerae* toxin coregulated pilin subunit that mediate bacterial colonization, Gene 192: 79-85.

Tascon R.I., Vasquez-Boland J.A., Gutiérrez-Martin C.B., Rodriguez-Barbosa I. & Rodriguez-Ferri E.F. (1996) Virulence factors of the swine pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Microbiologia, 12, 171-184.

Taylor D. J. (1999) *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Diseases of swine. Édité par: B. E. Straw, S. D'Allaire, W. L. Mengeling and D. J.Taylor. Ames, Iowa State University Press: 343-354.

Thwaites R. N. & Kadis S. (1991) Immunogenicity of *Actinobacillus pleuropneumoniae* outer membrane proteins and enhancement of phagocytosis by antibodies to the proteins. Infect. Immun., 59, 544-549.



Tonipak W., Thiede S. Oswald W., Baltes N. & Gerlach G.F. (2000) *Actinobacillus pleuropneumoniae* iron transport: a set of *exbBD* gene is transcriptionally linked to the *thpB* gene and required for utilization of transferrin-bound iron. Infect. Immun., 68, 1164-1170.

Udeze F.A., Latimer K.S. & Kadis S. (1987) Role of *Haemophilus pleuropneumoniae* lipopolysaccharide endotoxin in the pathogenesis of porcine *Haemophilus pleuropneumoniae*. Am. J. Vet. Res., 48, 768-773.

Ward, C.K., Inzana, T.J. (1994) Resistance of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to bactericidal antibody and complement is mediated by capsular polysaccharide and blocking antibody specific for lipopolysaccharides, J. Immunol. 153: 2110-2121.

Ward, C.K., Lawrence, M.L., Veit, H.P., Inzana, T.J. (1998) Cloning and mutagenesis of a serotype-specific DNA region involved in encapsulation and virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5a: concomitant expression of serotype 5a and 1 capsular polysaccharides in recombinant *A. pleuropneumoniae* serotype1, Infect. Immun. 66: 3326-3336.

Ward, C.K., Inzana, T.J. (1997) Identification and characterization of a DNA region involved in the export of capsular polysaccharide by *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5a, Infect. Immun. 65: 2491-2496.

Ward, J., Fletcher, J., Nair, S.P., Wilson, M., Williams, R.J., Poole, S., Henderson, B. (2001) Identification of the exported proteins of the oral opportunistic pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans* by using alkaline phosphatase fusions, Infect. Immun. 69: 2748-2752.

Willson P.J., Gerlach G.F., Klashinsky S. & Potter A.A. (2001) Cloning and characterization of the gene coding for NADPH-sulfite reductase hemoprotein from *Actinobacillus pleuropneumoniae* and use of the protein product as a vaccine. Can J. Vet. Res., 65, 206-212.

Wirth D., Gustin P., Drion P.V., Dessy-Doize C., Christians E.S., (2002). Les protéines de choc thermique (*heat shock proteins*) : Classification, structure, fonctions et implications dans les processus pathologiques., Ann. Méd. Vét., 146 : 201-216

Zhang, H.Z., Donnenberg, M.S. (1996) DsbA is required for stability of the type IV pilin of enteropathogenic *Escherichia coli*, Mol. Microbiol. 21: 787-797.

Zhang, Y., Tennent, J.M., Ingham, A., Beddome, G., Prideaux, C., Michalski, W.P. (2000) Identification of type 4 fimbriae in *Actinobacillus pleuropneumoniae*, FEMS Microbiol. Lett. 189: 15-18.